

การเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณอินซูลินโดยสารสกัดเมล็ดองุ่นในหนูเบาหวาน  
ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง



นางสาวอร่ามศรี มีพร้อม

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ALTERATION OF THE INSULIN SIGNALING PATHWAY BY GRAPE SEED EXTRACT  
IN HIGH-FRUCTOSE-INDUCED DIABETIC RATS



Miss Aramsri Meeprom

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณอินซูลินโดยสารสกัด  
เมล็ดองุ่นในหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่มี  
น้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

โดย

นางสาวอรามศรี มีพร้อม

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หยิบโชคอนันต์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา)

.....  
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หยิบโชคอนันต์)

.....  
(อาจารย์ สพ.ญ.ดร.ม.ล. นฤดี เกษมสันต์)

อร่ามศรี มีพร้อม : การเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณอินซูลินโดยสารสกัดเมล็ดองุ่นในหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง. (ALTERATION OF THE INSULIN SIGNALING PATHWAY BY GRAPE SEED EXTRACT IN HIGH-FRUCTOSE-INDUCED DIABETIC RATS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. สพ.ญ. ดร. ศิริรินทร์ หยิบโชคอนันต์, 104 หน้า.

การรับประทานน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานได้ การใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจึงอาจเป็นหนทางป้องกันการเกิดโรคเบาหวานอันเนื่องมาจากอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงที่คาดหวังผลได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดองุ่น (Grape seed extract; GSE) ในเชิงป้องกันการเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 โดยศึกษาผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ระดับน้ำตาลกลูโคส ฮอริโมนอินซูลินและไขมันในเลือด ปริมาณการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อ และมุ่งเน้นถึงการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF) นาน 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า หนูที่ได้รับ HF เสริมด้วย GSE มีระดับน้ำตาลกลูโคสและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว ระดับฮอริโมนอินซูลินในเลือดลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่มี ความแตกต่างระหว่างปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดหนูที่ได้รับ HF กับหนูที่ได้รับ HF เสริมด้วย GSE ส่วนการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์พบว่า GSE ไม่เพิ่มการแสดงออกของ Insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ ) และ Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) ในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย HF อย่างไรก็ตาม GSE สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินในช่วงปลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ได้แก่ Protein kinase B (PKB/Akt) และ Glucose transporter 4 (GLUT4) ส่งผลให้มีการขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ GSE ยังเพิ่มปริมาณการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อหนูที่ได้รับ HF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ GSE เป็นอาหารเสริมในเชิงป้องกันภาวะดื้ออินซูลินและโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ได้

ภาควิชา เคมีคลินิก.....  
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์.....  
ปีการศึกษา 2552.....

ลายมือชื่อผู้นิสิต.....อร่ามศรี.....มีพร้อม.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....*Dr. Sirichai*.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....*Dr. Sirintra*.....

# # 5077205537 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE  
KEYWORDS : GRAPE SEED EXTRACT / INSULIN SIGNALING / HIGH-FRUCTOSE DIET

ARAMSRI MEEPROM : ALTERATION OF THE INSULIN SIGNALING PATHWAY  
BY GRAPE SEED EXTRACT IN HIGH-FRUCTOSE-INDUCED DIABETIC RATS.  
THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SIRICHAJ ADISAKWATTANA, Ph.D., THESIS  
CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRINTORN YIBCHOK-ANUN, D.V.M., Ph.D.,  
104 pp.

Consumption of high dietary fructose is an important factor contributing to the growing worldwide prevalence of diabetes mellitus. Finding effective plant foods and their ingredients can be beneficial in the prevention of high-fructose diet induced diabetes. The aim of this study was to investigate the preventive effect of grape seed extract (GSE) on the alteration of body weight, plasma glucose, plasma insulin, lipid profiles, glycogen accumulation and the expression of insulin signaling proteins in a high-fructose-diet (HF) induced diabetic rats. The results showed that a high-fructose diet supplemented with GSE caused no change in rat body weight, whereas it significantly decreased plasma glucose and triglyceride concentration ( $p < 0.05$ ). The plasma insulin concentration of HF supplemented with GSE tended to decrease when compared to HF group but not significant. There were no significant differences in plasma cholesterol between HF and HF supplemented with GSE. Moreover, GSE did not alter the levels of expression of insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ ) and insulin receptor substrate 1 (IRS-1) in HF induced diabetic rats, whereas it increased the expression of downstream signaling proteins of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) including protein kinase B (PKB/Akt) and glucose transporter 4 (GLUT4), resulting in a consequential increase of glucose uptake. These results also showed that HF supplemented with GSE significantly increased in glycogen accumulation in skeletal muscle ( $p < 0.05$ ). From this point of view, GSE is a possible strategy for prevention of patients with type 2 diabetes mellitus.

Department : ...Clinical Chemistry.....

Student's Signature *อร่ามศรี มีพรหม*

Field of Study : ...Clinical Biochemistry.....

Advisor's Signature *Smit Adisattar*

...and Molecular Medicine.....

Co-Advisor's Signature *Dr. Sirintorn*

Academic Year : 2009.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างมากต่องานวิจัยและการทำงานอื่นๆ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศรินทร หยิบโชคนันต์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ข้อแนะนำ ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ สพ.ญ.ดร.ม.ล. นฤดี เกษมสันต์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาใช้เวลาตลอดทั้งให้คำแนะนำ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่าและความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช เพื่อสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วินัย ตะห์สัน ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ภายในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ของโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในส่วนของสัตว์ทดลอง อีกทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเวชศาสตร์และการธนาคารเลือด และภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีบางชนิด ตลอดจนเครื่องมือบางอย่างในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา และขอขอบคุณนิสิตปริญญาโทและเอกหลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. โรคเบาหวาน.....	5
2. ภาวะสมดุลงระดับน้ำตาลในเลือด.....	7
2.1 การคุมช้มน้ำตาลกลูโคส.....	7
2.2 การรักษาสมดุลระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด.....	8
2.3 เมตาบอลิซึมของกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิส.....	9
3. อินซูลิน.....	12
4. การส่งสัญญาณอินซูลิน (Insulin signaling pathway).....	14
5. การส่งสัญญาณอินซูลินผ่าน PI3K-dependent pathway.....	15
6. ภาวะดื้ออินซูลิน.....	18
6.1 สาเหตุของภาวะดื้ออินซูลิน.....	19
7. น้ำตาลฟรุกโตส.....	21
7.1 เมตาบอลิซึมของน้ำตาลฟรุกโตส.....	22
7.2 บทบาทของน้ำตาลฟรุกโตสต่อการเกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	26
8. ยารักษาโรคเบาหวาน Rosiglitazone.....	27

บทที่	หน้า
8.1 รายละเอียดตัวยา.....	27
8.2 สรรพคุณและข้อบ่งชี้การใช้ยา.....	28
8.3 เมตาบอลิซึมของยา.....	28
8.4 การออกฤทธิ์ของยา.....	28
8.5 ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น.....	28
9. สารโพลีฟีนอล (Polyphenols).....	29
10. สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract).....	29
10.1 การศึกษาความเป็นพิษและความปลอดภัยของการใช้สารสกัดเมล็ดองุ่น.....	31
10.2 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเมล็ดองุ่น.....	32
10.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการต้านอนุมูลอิสระและลดระดับน้ำตาลในเลือด.....	33
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	36
1. น้ำยาและสารเคมี.....	36
2. เครื่องมือและอุปกรณ์.....	38
3. การเตรียมเครื่องมือวิจัย.....	39
3.1 การเตรียมสารสกัดเมล็ดองุ่น.....	39
3.2 การเตรียมสัตว์ทดลองและอาหารสำหรับสัตว์ทดลอง.....	39
4. วิธีการวิจัย.....	41
4.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract ; GSE) ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว พฤติกรรม และลักษณะทางกายภาพของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet ; HF) ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	41
4.2 การศึกษาฤทธิ์ของGSE ต่อระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	41
4.3 การศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อระดับไขมันในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	43



บทที่	หน้า
4.4 การศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	46
4.5 การศึกษาผลของ GSE ต่อระดับการแสดงออก (Expression) ของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูขาวด้วยเทคนิค Western blot หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์.....	47
5. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	53
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	54
1. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract ; GSE) ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet ; HF) ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	54
2. ผลการศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	57
3. ผลการศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อระดับไขมันในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	63
4. ผลการศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	66
5. ผลการศึกษาผลของ GSE ต่อระดับการแสดงออก (Expression) ของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลิน ในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูขาวด้วยเทคนิค Western blot หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์.....	69
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	77
สรุปผลการวิจัย.....	77
อภิปรายผลการวิจัย.....	80
ข้อเสนอแนะ.....	88

	ญ
บทที่	หน้า
รายการอ้างอิง.....	89
ภาคผนวก.....	98
ภาคผนวก ก.....	99
ภาคผนวก ข.....	102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	104



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงหน้าที่ของฮอร์โมนอินซูลิน.....	14
2.2	แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเมล็ดองุ่น (GSE) ใน บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	32
2.3	แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเมล็ดองุ่น (GSE) ใน บทบาทอื่นๆ.....	33
3.1	แสดงส่วนผสมของอาหารสำหรับการทดลอง (กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม).....	40
3.2	แสดงรูปแบบของการให้อาหารหนูทดลองทั้ง 6 กลุ่ม.....	40
4.1	แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักและการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของหนูทดลองหลัง สิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์.....	56
4.2	แสดงปริมาณการกินอาหารและน้ำของหนูทดลองโดยเฉลี่ยต่อวัน.....	56
4.3	แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส ระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมา และค่า HOMA- IR ของหนูทดลอง.....	59
4.4	แสดงระดับคอเลสเตอรอล ระดับไตรกลีเซอไรด์ และระดับ HDL ในพลาสมา ของหนูทดลอง หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์.....	64
4.5	แสดงปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูทดลอง หลังสิ้นสุด ระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์.....	67
4.6	แสดงระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณ อินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูทดลอง หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์.....	76

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส.....	7
2.2	แสดงกระบวนการไกลโคไลซิส.....	9
2.3	แสดงวัฏจักรเครปส์.....	10
2.4	แสดงโครงสร้างสามมิติของฮอร์โมนอินซูลิน.....	12
2.5	แสดงการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนอันเนื่องมาจากระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้น.....	13
2.6	แสดงการกระตุ้นของอินซูลินผ่านการส่งสัญญาณภายในเซลล์ 3 ทาง.....	15
2.7	แสดงการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลินผ่าน insulin receptor ใน PI3K-dependent pathway.....	18
2.8	แสดงกลไกการเกิดภาวะดื้ออินซูลินอันเนื่องมาจากกรดไขมันอิสระผ่านกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์.....	20
2.9	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส.....	22
2.10	แสดงการดูดซึมน้ำตาลฟรุกโตส.....	22
2.11	แสดงเมตาบอลิซึมของน้ำตาลฟรุกโตสในเซลล์ตับ.....	24
2.12	แสดงจุดบรรจบกันของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของฟรุกโตสและไกลโคไลซิสของกลูโคสในเซลล์ตับ.....	25
2.13	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Rosiglitazone.....	27
2.14	แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มโพลีฟีนอลที่พบมากในเมล็ดองุ่น.....	30
2.15	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Proanthocyanidin.....	31
4.1	แสดงผลการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาการทดลอง นับตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 56.....	54
4.2	แสดงระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาขณะอดอาหารของหนูแต่ละกลุ่มทดลอง.....	60
4.3	แสดงระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาขณะอดอาหารของหนูแต่ละกลุ่มทดลอง.....	61
4.4	แสดงระดับภาวะดื้ออินซูลินจากค่า HOMA-IR ของหนูแต่ละกลุ่มทดลอง.....	62
4.5	แสดงระดับไขมันในพลาสมาของหนูแต่ละกลุ่มทดลองหลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์.....	65

4.6	แสดงปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูแต่ละกลุ่มทดลองหลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์.....	68
4.7	แสดงระดับการแสดงออกของ Insulin receptor $\beta$ (IR $\beta$ ) ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูทดลอง.....	70
4.8	แสดงระดับการแสดงออกของ Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูทดลอง.....	72
4.9	แสดงระดับการแสดงออกของ Protein kinase B (PKB/Akt) ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูทดลอง.....	73
4.10	แสดงระดับการแสดงออกของ Glucose transporter 4 (GLUT4) ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูทดลอง.....	75



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวานประเภทที่ 2 (Type 2 Diabetes) จัดเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย และสร้างความลำบากให้กับญาติและครอบครัว เนื่องจากมีจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทนี้สูงถึงร้อยละ 90-95 ของผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งหมด [1, 2] โดยพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคเบาหวานประเภทนี้ได้แก่ ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Insulin resistance) ซึ่งเป็นภาวะความผิดปกติหนึ่งในกลุ่มความผิดปกติที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) เรียกว่า metabolic syndrome [3] โรคเบาหวานมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากอดีตจนถึงปัจจุบัน และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นอีกในอนาคต จากรายงานผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลกในปี ค.ศ.2000 พบผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้นกว่า 171 ล้านคน และในปี ค.ศ.2030 คาดว่าจะมีผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นเป็น 366 ล้านคน [4] ส่งผลกระทบต่อภาวะเศรษฐกิจในหลายประเทศ อาทิ ประเทศที่พัฒนาแล้วอย่างสหรัฐอเมริกา ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานและภาวะแทรกซ้อนในปี ค.ศ.2002 รวมทั้งสิ้นกว่า 132 พันล้านดอลลาร์ ซึ่งมากกว่าร้อยละ 50 เป็นผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 65 ปี [5] ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 สหรัฐอเมริการายงานจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานที่อายุมากกว่า 20 ปีเพิ่มขึ้นอีก 1.5 ล้านคน และได้จัดโรคเบาหวานเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆของประเทศ [6] โดยรวมแล้วในปีดังกล่าวมีจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานทั่วโลกประมาณ 1.1 ล้านคน เฉลี่ยนาทีละ 2 คน ในขณะที่ประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นเช่นกัน กระทรวงสาธารณสุขได้จัดให้โรคเบาหวานเป็น 1 ใน 5 ของโรคร้ายที่คร่าชีวิตคนไทยมากที่สุด และเป็นที่น่าวิตกที่ในปัจจุบันประเทศไทยติดอันดับ 4 ของจำนวนผู้ป่วยเบาหวานมากที่สุดในเอเชีย [7]

ความรุนแรงของโรคเบาหวานส่งผลให้หลายประเทศทั่วโลกให้ความสำคัญกับการป้องกันและหาวิธีการในการรักษาดูแลผู้ป่วยเบาหวานมากยิ่งขึ้น แม้ว่าการศึกษาจำนวนมากสามารถพิสูจน์ได้แล้วว่าโรคเบาหวานสามารถป้องกันได้ โดยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม การดำรงชีวิตและลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค สามารถลดอัตราการเกิดโรคได้ถึงร้อยละ 58 อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่พบคือ มีผู้ป่วยจำนวนไม่น้อยที่เป็นโรคเบาหวานโดยไม่รู้ตัว หรือมีการตรวจวินิจฉัยที่ล่าช้า ทำให้รู้ตัวก็ต่อเมื่อเป็นโรคแล้ว ดังตัวอย่างในประเทศไทย มีผู้ป่วยกว่าร้อยละ 50 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมดในประเทศหรือประมาณ 1.8 ล้านคนที่ไม่รู้ตัวว่าเป็นโรคนี้ [8] ทำให้ผู้ป่วยสูญเสียโอกาสในการป้องกันการเกิดโรค

ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาจำนวนมากที่มีวัตถุประสงค์ในการแสวงหาทางเลือกใหม่ เพื่อให้ผู้รักสุขภาพได้ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและผู้ป่วยได้รับการบำบัดที่เจ็บตัวน้อยที่สุด โดยทางเลือกที่คาดหวังผลได้และก่อให้เกิดอันตรายน้อยมักเกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรรวมถึงผลไม้หรือพืชท้องถิ่น [9] เนื่องจากพืชส่วนใหญ่มีสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นสารสำคัญ จึงมีบทบาทในการลดอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของการทำลายเซลล์และเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงว่าสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ชนิดโปรแอนโทไซยานิดิน (Proanthocyanidin) ที่พบมากในเมล็ดและเปลือกขององุ่น มีสรรพคุณทางการแพทย์ที่หลากหลาย อาทิ สรรพคุณในการต้านมะเร็ง ด้านการอักเสบ ด้านเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น ทั้งนี้บทบาทที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับได้แก่ ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินซี อี และเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากัน [10] ต่อมาจึงเริ่มมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานและพบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย streptozotocin และ alloxan ได้ [11,12] นอกจากนี้สารทั้งสองชนิดนี้แล้ว น้ำตาลฟรุกโตสยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดโรคเบาหวานและภาวะดื้ออินซูลินได้เช่นกัน แม้ว่าการรับประทานน้ำตาลฟรุกโตสเป็นสารให้ความหวานในขนมหวานหรือเครื่องดื่มแทนน้ำตาลทรายมีมาอย่างต่อเนื่อง แต่จากการศึกษาวิจัยชี้ให้เห็นว่า การได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet) ติดต่อกันเป็นเวลานาน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาล อินซูลินและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง [13-16] และลดการแสดงออกรวมถึงการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินอันเป็นเหตุให้เกิดความบกพร่องในการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ [15,17] โดยผลจากเมตาบอลิซึมของฟรุกโตสซึ่งไม่ผ่านการควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ ก่อให้เกิดการสังเคราะห์สารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์กลูโคสในเซลล์ตับเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังเพิ่มการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับ [18] และเร่งการสลายไขมันในเซลล์ไขมัน นำไปสู่การปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (Free fatty acids; FFA) ออกสู่กระแสเลือดมากขึ้น ซึ่ง FFA เป็นตัวการสำคัญหนึ่งที่ทำให้กระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์เป้าหมายของอินซูลินเกิดความบกพร่อง กลายเป็นภาวะดื้ออินซูลินและโรคเบาหวานในที่สุด [19] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการป้องกันภาวะดื้ออินซูลินและโรคเบาหวานประเภทที่ 2 อันเนื่องมาจากการตอบสนองของเซลล์เป้าหมายต่ออินซูลินในระดับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ รวมถึงการแสดงออกของสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ในระดับโมเลกุล โดยการเหนี่ยวนำของอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

การศึกษาคั้งนี้จึงมีความสนใจศึกษาผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดดองุ่นต่อการส่งสัญญาณในเซลล์เป้าหมายที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นของฮอร์โมนอินซูลิน โดยศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคส ฮอร์โมนอินซูลิน และไขมันในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินจากการให้อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณสูง และผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวส่งสัญญาณในเซลล์ที่ตอบสนองต่อการทำงานของอินซูลิน รวมถึงผลต่อปริมาณการสะสมไกลโคเจนในเซลล์กล้ามเนื้อ ด้วยหวังว่าการศึกษานี้จะก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชวิทยาที่จะใช้เป็นพื้นฐานและแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือตัวยาในการป้องกันหรือรักษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ต่อไปในอนาคต

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดดองุ่นเกี่ยวกับการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูขาวที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีภาวะดื้อต่ออินซูลินจากอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดดองุ่นต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ระดับอินซูลิน ระดับไขมันในเลือด รวมถึงปริมาณการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อ ของหนูขาวที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีภาวะดื้อต่ออินซูลินจากอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
3. เพื่อศึกษาผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดดองุ่นต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวรับอินซูลินบนเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ และโปรตีนขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์อันเนื่องมาจากการกระตุ้นของอินซูลิน

### ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดดองุ่นในเชิงป้องกันภาวะดื้ออินซูลินในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยวิเคราะห์ผลของสารสกัดเมล็ดดองุ่นต่อน้ำหนักตัว ระดับน้ำตาลกลูโคส ระดับอินซูลิน ระดับไขมันในเลือด ปริมาณการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อ และการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อหนูขาว



### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นทั้งในเชิงป้องกันและเชิงรักษาความไวของเซลล์ในการตอบสนองต่ออินซูลินในหนูขาวที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีภาวะดื้อต่ออินซูลินจากอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
2. ทราบถึงบทบาทการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวรับอินซูลินบนเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ และโปรตีนขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์อันเนื่องมาจากการกระตุ้นของอินซูลินภายในเซลล์ในหนูขาวที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีภาวะดื้อต่ออินซูลินจากอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
3. เป็นข้อมูลในการพิจารณาสารสกัดจากเมล็ดองุ่นเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อป้องกันการเกิดโรคเบาหวานและภาวะดื้ออินซูลิน
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

##### 1. โรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน (Diabetes Mellitus) จัดอยู่ในกลุ่มความผิดปกติที่เรียกว่า metabolic syndrome ซึ่งเป็นกลุ่มของภาวะที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) ตามเกณฑ์ที่กำหนดโดยสมาพันธ์โรคเบาหวานสากล (International Diabetes Federation; IDF) ดังนี้ 1) มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง (Hyperglycemia) ร่วมกับภาวะดื้ออินซูลิน (Insulin resistance) 2) มีระดับไขมันในเลือดที่ผิดปกติ (Dyslipidemia) กล่าวคือ ระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์สูง ในขณะที่ระดับ HDL ต่ำ 3) มีลักษณะอ้วนลงพุง (Abdominal obesity) และ 4) ความดันในเลือดสูง (Hypertension) โดยผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะ metabolic syndrome ดังกล่าวนี้อาจมีโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดสูงขึ้น เป็นเหตุให้อัตราการเสียชีวิตสูงขึ้นด้วย [3]

โรคเบาหวานจึงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่ทุกภูมิภาคทั่วโลกต้องให้ความสำคัญ เพราะไม่เพียงอาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตด้วยสาเหตุจากโรคหัวใจและหลอดเลือดแล้ว ผู้ป่วยโรคเบาหวานยังต้องควบคุมดูแลตนเองอย่างเข้มงวดเพื่อป้องกันภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นตามอวัยวะต่างๆ อาทิ ตา (Diabetic retinopathy) ไต (Diabetic nephropathy) และระบบประสาท (Diabetic neuropathy) องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) รายงานความชุกของผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลกในปี ค.ศ.2000 เป็นจำนวนทั้งสิ้นกว่า 171 ล้านคน และได้คาดการณ์จำนวนผู้ป่วยเบาหวานในปี ค.ศ.2030 จะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 366 ล้านคน [4] แนวโน้มดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความรุนแรง และสร้างค่าใช้จ่ายมหาศาลในการรักษาพยาบาล หากประชากรโลกยังไม่หันมาใส่ใจดูแลสุขภาพและปรับเปลี่ยนพฤติกรรมดำรงชีวิตและการบริโภคอย่างจริงจัง ก็ไม่อาจหยุดยั้งการเพิ่มขึ้นนี้ได้

โรคเบาหวานแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ ตามความผิดปกติในการหลั่งและการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน

##### 1. โรคเบาหวานประเภทที่ 1 (Type 1 Diabetes Mellitus)

เดิมเรียกว่า Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาด้วยการฉีดฮอร์โมนอินซูลินวันละครั้ง เนื่องจากความบกพร่องในการผลิตและหลั่งฮอร์โมน

อินซูลินของตับอ่อน จากการที่  $\beta$ -cell มีความผิดปกติตั้งแต่กำเนิดหรือถูกทำลายภายหลังจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การติดเชื้อไวรัสบางชนิด หรือถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเอง ทำให้มีปริมาณอินซูลินไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายเพื่อใช้ในการขนส่งน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นในที่สุด นอกจากนี้ ผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 1 ยังมีภาวะกรดคีโตนคั่งในเลือดจากการที่ร่างกายใช้กรดไขมันเป็นแหล่งพลังงานแทนการใช้พลังงานจากกลูโคส ในจำนวนผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมดพบผู้ป่วยเบาหวานประเภทนี้เพียง 5-10 % โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเด็กหรือวัยรุ่นและมักเกี่ยวเนื่องจากผลทางพันธุกรรม [20]

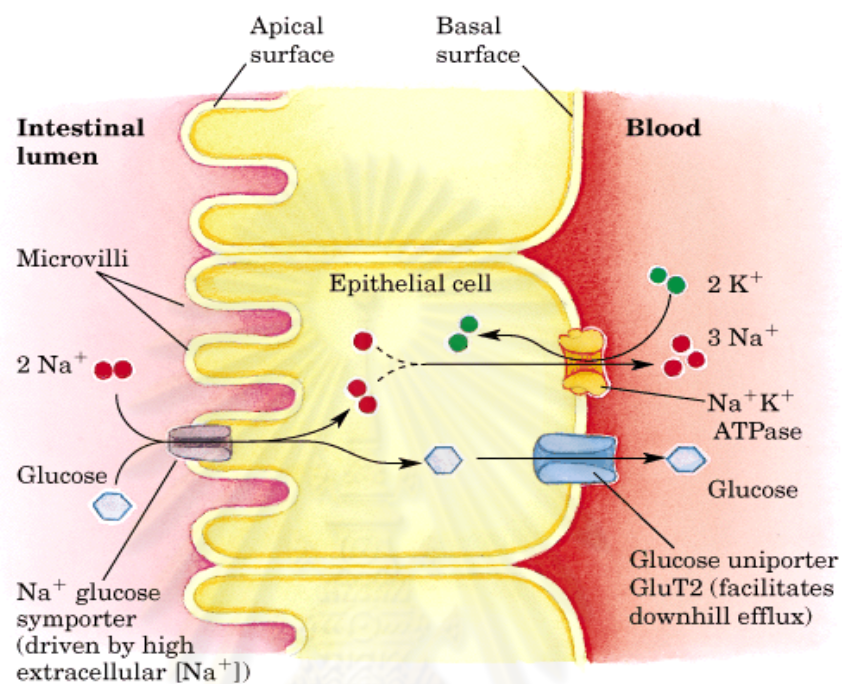
## 2. โรคเบาหวานประเภทที่ 2 (Type 2 Diabetes Mellitus)

เดิมเรียกว่า Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) ผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทนี้ไม่ต้องรับการฉีดอินซูลินในการรักษา เนื่องจากตับอ่อนยังสามารถสร้างและหลั่งฮอร์โมนอินซูลินได้ เพียงแต่เซลล์เป้าหมายไม่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลิน นั่นคือ มีอินซูลินแต่ไม่สามารถทำงานได้ อันเกิดจากความบกพร่องบางประการในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เรียกภาวะนี้ว่า ภาวะดื้ออินซูลิน (Insulin resistance) ซึ่งสาเหตุของภาวะดื้ออินซูลินนี้เกิดได้หลายทาง ทั้งจากปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ทำให้จำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทนี้มีสูงถึง 90-95 % ของจำนวนผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด [20] ผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 จะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเช่นเดียวกับประเภทที่ 1 แต่ไม่มีภาวะกรดคีโตนคั่งในเลือดร่วมด้วย ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานประเภทนี้มักเพิ่มขึ้นตามอายุ คือพบในผู้สูงอายุมากกว่าในเด็ก นอกจากนี้ ความอ้วนยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการเกิดภาวะดื้ออินซูลินและโรคเบาหวานประเภทที่ 2 [21]

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2. ภาวะสมดุลของระดับน้ำตาลในเลือด (Glucose Homeostasis)

### 2.1 การดูดซึมน้ำตาลกลูโคส



**ภาพที่ 2.1** การดูดซึมน้ำตาลกลูโคส : หลังจากสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยในลำไส้เล็กส่วนต้นกลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และกาแลกโตสแล้ว น้ำตาลกลูโคสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ผนังลำไส้ (epithelium cell) พร้อมกับโซเดียม ( $\text{Na}^+$ ) ผ่านโปรตีนขนส่งที่มีชื่อว่า  $\text{Na}^+$  glucose co-transporter หรือ SGLT1 [22] จากนั้นดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดผ่านโปรตีนขนส่งกลูโคสแบบไม่ใช้พลังงานชนิด GLUT2 ขนส่งไปยังอวัยวะต่างๆ เพื่อผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมและสังเคราะห์พลังงานต่อไป

รูปภาพจาก :

<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/LIPIDS/transport.html>

## 2.2 การรักษาสมดุลระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด

ในคนปกติ ระดับกลูโคสในเลือดจะเพิ่มสูงขึ้นขณะรับประทานอาหาร และสูงสุดหลังรับประทานอาหารประมาณ 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง จากนั้นลดลงสู่ระดับปกติภายใน 2 ชั่วโมง โดยการเร่งการนำกลูโคสเข้าเซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงานในเซลล์และเก็บสำรองยามขาดแคลน ในทางตรงกันข้าม เมื่อร่างกายขาดอาหาร ส่งผลให้ระดับกลูโคสในเลือดลดลง เซลล์จะทำหน้าที่ขจัดเศษกลูโคสในเลือดให้อยู่ในระดับปกติด้วยการสังเคราะห์กลูโคสจากพลังงานที่เก็บสำรองเหล่านั้น การตอบสนองของร่างกายต่อการเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดนี้เป็นกลไกการรักษาสมดุลกลูโคสเพื่อป้องกันภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะผิดปกติ โดยเฉพาะโรคเบาหวานซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งของโรคหัวใจและหลอดเลือด นอกจากนี้ยังเพื่อป้องกันภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกายได้เช่นกัน เนื่องจากอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะสมอง มีความต้องการใช้กลูโคสในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์

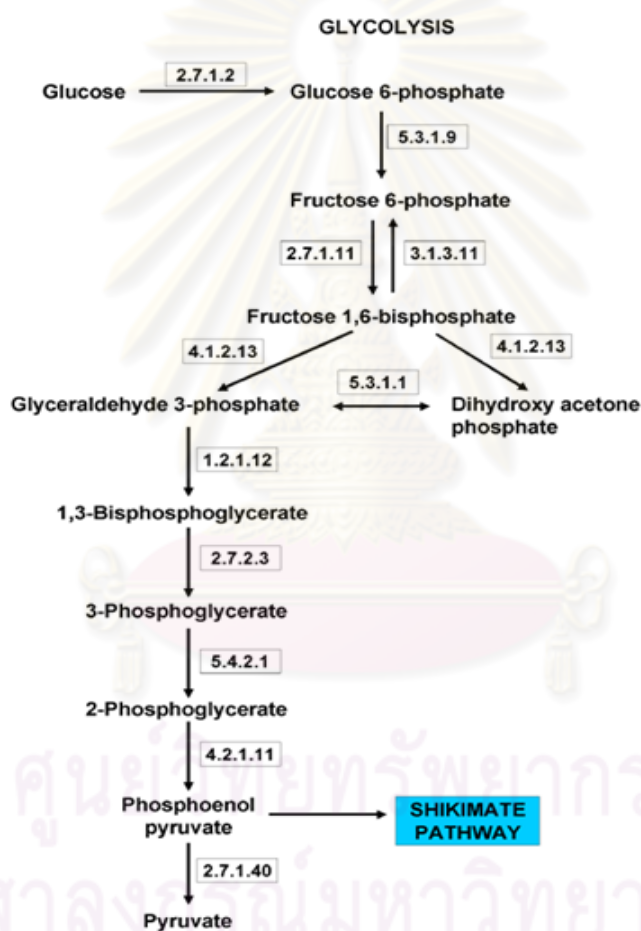
การควบคุมภาวะสมดุลกลูโคสดังกล่าวอาศัยการทำงานร่วมกันของฮอร์โมนจากตับอ่อน 2 ชนิด ได้แก่ ฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin) และฮอร์โมนกลูคากอน (Glucagon) ผ่านการกระตุ้นอวัยวะเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของกลูโคส เพื่อปรับสมดุลระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้คงที่ อวัยวะเป้าหมายดังกล่าว ได้แก่ ตับ กล้ามเนื้อลาย และเนื้อเยื่อไขมัน

ตับ เป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลน้ำตาลในเลือดทั้งขณะรับประทานอาหารและอดอาหาร โดยหลังรับประทานอาหาร ผลการออกฤทธิ์ของอินซูลินจะกระตุ้นให้ตับเพิ่มการใช้กลูโคสด้วยการสังเคราะห์พลังงานจากกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิส ลดการสังเคราะห์กลูโคสจากภายในเซลล์ ลดการสลายและเพิ่มการสร้างแหล่งพลังงานสำรอง ได้แก่ ไกลโคเจน และในขณะอดอาหาร ฮอร์โมนกลูคากอนจะกระตุ้นให้ตับลดการใช้กลูโคสในการสังเคราะห์พลังงาน เพิ่มการสังเคราะห์กลูโคสภายในเซลล์จากหน่วยย่อยของโปรตีนและไขมัน ได้แก่ กรดอะมิโนและกรดไขมัน ตามลำดับ ในกรณีที่อดอาหารยาวนาน 6-12 ชั่วโมง ตับจะเร่งการสลายไกลโคเจนเพื่อสร้างกลูโคส ทดแทนกลูโคสในเลือดให้มีระดับสูงขึ้นเป็นปกติ จึงกล่าวได้ว่า ตับเป็นอวัยวะที่ตอบสนองต่อสัญญาณที่บ่งชี้ถึงระดับการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกลูโคสในเลือด

กล้ามเนื้อลายและเนื้อเยื่อไขมัน เป็นอวัยวะส่วนปลาย (Peripheral tissues) ที่สำคัญต่อการรักษาระดับน้ำตาลในเลือดโดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังรับประทานอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากสามารถเพิ่มการขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ได้ด้วยการกระตุ้นของฮอร์โมนอินซูลิน เพื่อลดระดับกลูโคสในเลือดสู่ระดับปกติ

## 2.3 เมตาบอลิซึมของกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิส

ไกลโคไลซิส (Glycolysis) เป็นกระบวนการออกซิเดชันของกลูโคสเพื่อให้ได้สารตั้งต้นเข้าสู่กระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์ในรูปของ adenosine triphosphate หรือ ATP โดยกลูโคสจะผ่านปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์หลายขั้นตอนได้เป็น pyruvate หรือ lactate ขึ้นอยู่กับสภาวะการใช้ออกซิเจน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic condition) ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คือ pyruvate (ภาพที่ 2.2) ส่วนสภาวะที่ขาดออกซิเจน (Anaerobic condition) หรือขณะออกกำลังกาย ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ lactate



ภาพที่ 2.2 กระบวนการไกลโคไลซิส : ตัวเลขที่ปรากฏแต่ละขั้นตอนคือ เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา

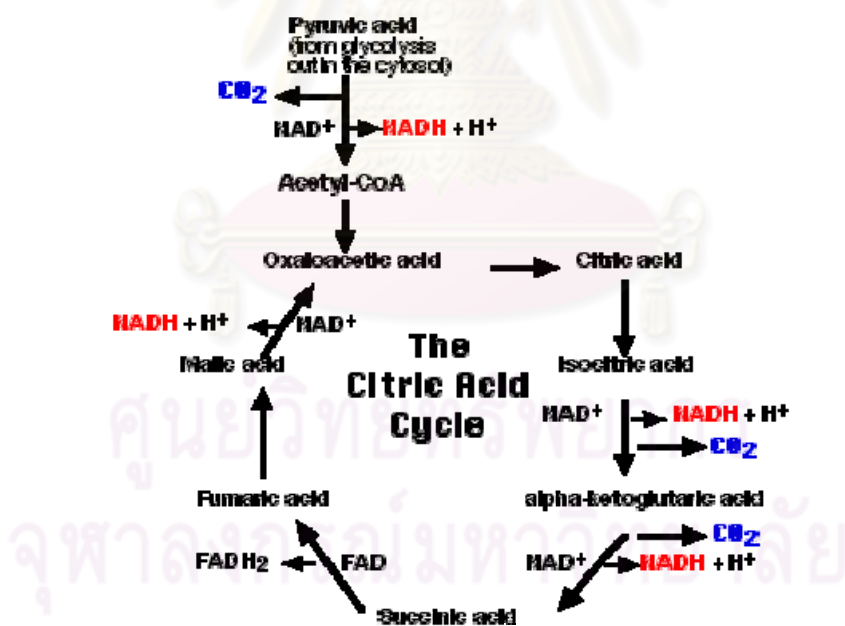
- 2.7.1.2 : Glucokinase
- 5.3.1.9 : Glucose-6-phosphate isomerase
- 2.7.1.11 : Phosphofructokinase I
- 3.1.3.11 : Fructose-bisphosphatase
- 4.1.2.13 : Aldolase

- 5.3.1.1 : Triosephosphate isomerase  
 1.2.1.12 : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)  
 2.7.2.3 : Phosphoglycerate kinase  
 5.4.2.1 : Phosphoglycerate mutase  
 4.2.1.11 : Enolase  
 2.7.1.40 : Pyruvate kinase

รูปภาพจาก :

<http://apps.missouristate.edu/mtngrv/CGB/PhenolBiosynthesisMap/Glycolysis.htm>

Pyruvate ที่ได้จากกระบวนการไกลโคไลซิส จะถูกเปลี่ยนเป็น acetyl coenzyme A (acetyl CoA) เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle/Citric acid cycle) เพื่อสังเคราะห์ NADH และ  $FADH_2$  (ภาพที่ 2.3) จากนั้นขนส่งอิเล็กตรอนที่ได้ผ่านกระบวนการ electron transport chain ภายในไมโทคอนเดรีย เกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ  $H_2O$  และ ATP



ภาพที่ 2.3 วัฏจักรเครปส์ : Kreb's cycle หรือ Citric acid cycle เกิดขึ้นในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรีย หลังจากที่ได้ pyruvate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากกระบวนการไกลโคไลซิสในไซโตซอล ถูกเปลี่ยนเป็น acetyl CoA เพื่อเข้าสู่วัฏจักรดังกล่าว

รูปภาพจาก :

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/CellularRespiration.html>

กระบวนการไกลโคไลซิสถูกควบคุมด้วยกลไกการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด ดังนี้

### 1. เอนไซม์ Glucokinase และ Hexokinase (HK)

เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการไกลโคไลซิสในเซลล์ตับและกล้ามเนื้อ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน glucose เป็น glucose-6-phosphate (G6P) อย่างไรก็ตาม เมื่อร่างกายขาดน้ำตาลกลูโคสในขณะอดอาหาร เซลล์จะใช้ไกลโคเจนเป็นแหล่งพลังงานแทนผ่านกระบวนการสลายไกลโคเจน (Glycogenolysis) กระบวนการดังกล่าวจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น G6P จำนวนมากพอ จึงไม่จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ glucokinase หรือเอนไซม์ HK ในการเปลี่ยน glucose เป็น G6P อีก ปฏิกิริยาที่เกิดจากเอนไซม์ชนิดนี้จึงไม่ใช่ major control point ในกระบวนการไกลโคไลซิส

### 2. เอนไซม์ Pyruvate kinase (PK)

เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงระหว่าง phosphoenolpyruvate และ pyruvate เมื่อมีปริมาณ ATP มากพอ เอนไซม์ PK จะมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการสังเคราะห์ กลูโคสจากแหล่งอื่น (Gluconeogenesis) ผ่านกระบวนการ reverse glycolysis ด้วยเหตุนี้ ปฏิกิริยาที่เกิดจากเอนไซม์ชนิดนี้จึงไม่ใช่ major control point ในกระบวนการไกลโคไลซิสเช่นกัน

### 3. เอนไซม์ Phosphofructokinase-1 (PFK-1)

เป็น tetrameric enzyme ที่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้ 2 แบบ ได้แก่ โครงสร้างแบบ R และโครงสร้างแบบ T ในแต่ละแบบจะมีบริเวณที่สามารถจับกับ ATP (ATP binding site) 2 จุด คือ substrate site และ inhibitory site เนื่องจาก ATP เป็นได้ทั้งสารตั้งต้น และตัวยับยั้งของเอนไซม์ PFK-1 โดย ATP จะจับกับ substrate site ได้พอกๆกัน ไม่ว่าเอนไซม์ PFK-1 จะอยู่ในโครงสร้างใด ในขณะที่สามารถจับกับ inhibitory site ของเอนไซม์ PFK-1 ได้ต่อเมื่ออยู่ในโครงสร้างแบบ T เท่านั้น นอกจาก ATP แล้ว fructose-6-phosphate (F6P) ยังเป็นสารตั้งต้นอีกตัวที่สามารถจับกับเอนไซม์ PFK-1 ได้ เมื่อเอนไซม์มีโครงสร้างแบบ R

เมื่อใดก็ตามที่ ATP มีปริมาณสูงมากพอ เอนไซม์ PFK-1 จะมีแนวโน้มเปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบ T มากขึ้น เพื่อเพิ่มการจับกันระหว่าง ATP กับ inhibitory site ของเอนไซม์ และขัดขวางการจับและเร่งปฏิกิริยาของ F6P ให้น้อยลง ส่งผลให้เกิดการควบคุมการทำงานและยับยั้งกระบวนการไกลโคไลซิสได้ ดังนั้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการเร่งของเอนไซม์ PFK-1 จึงเป็น rate-limiting step ของกระบวนการไกลโคไลซิส

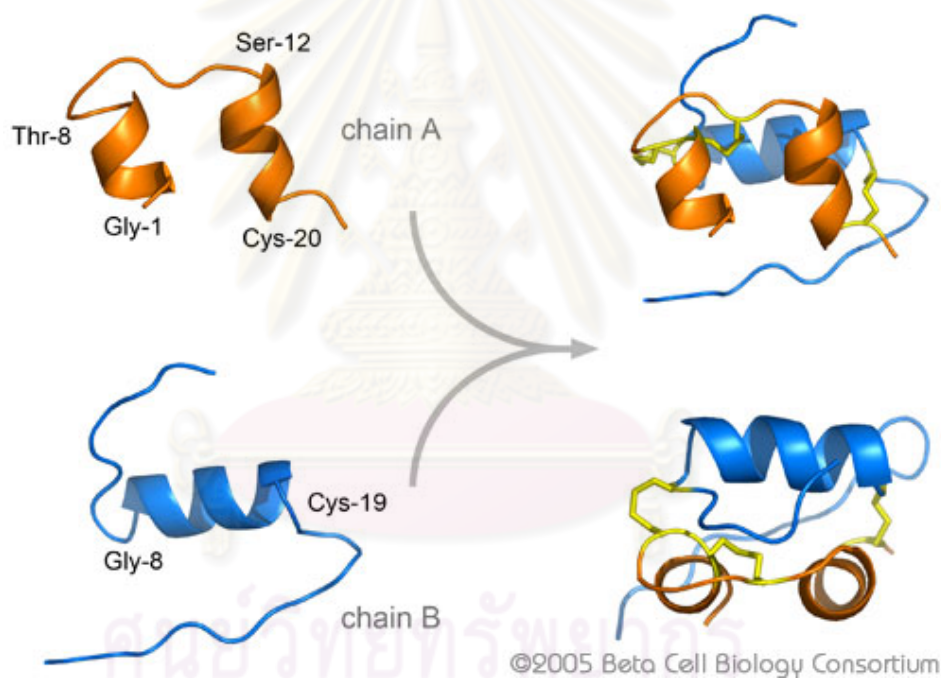
กล่าวได้ว่า เมตาบอลิซึมของกลูโคสถูกจำกัดด้วยความสามารถในการเก็บกักกลูโคส ในรูปของไกลโคเจน และการยับยั้งกระบวนการไกลโคไลซิสด้วย ATP ผ่านเอนไซม์ PFK-1 ซึ่งเป็น rate-limiting enzyme



กระบวนการไกลโคไลซิส นอกจากจำเป็นต้องมีอะตอมคาร์บอนจากโมเลกุลของกลูโคสแล้ว ยังสามารถรับคาร์บอนจากแหล่งอื่นหรือที่เรียกว่า non-glucose carbons เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการไกลโคไลซิสได้อีกด้วย แหล่งคาร์บอนอื่นนอกเหนือจากกลูโคส ได้แก่ ฟรุกโตส (fructose) กาแลกโตส (galactose) แมนโนส (mannose) กลิเซอรอล (glycerol) และกลูคูโรเนท (glucuronate)

### 3. อินซูลิน

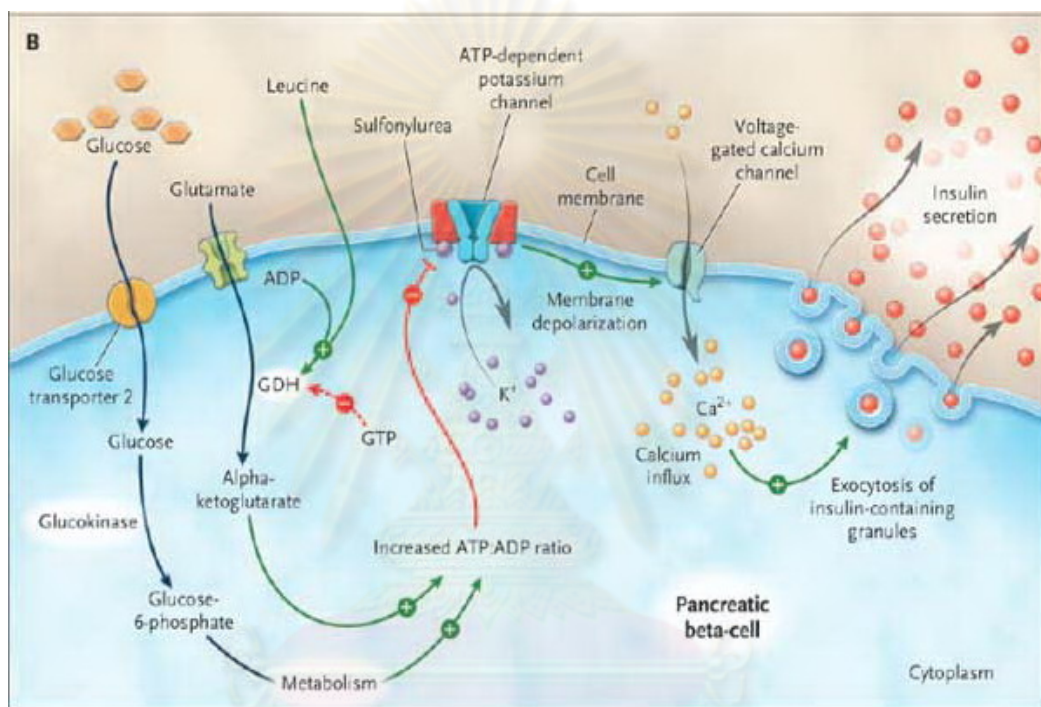
อินซูลินเป็นฮอร์โมนชนิดโพลีเปปไทด์ขนาด 5.808 kDa (ภาพที่ 2.4) สร้างและหลั่งจาก  $\beta$ -cells ของ Islets of Langerhans ในตับอ่อน



**ภาพที่ 2.4** โครงสร้างสามมิติของฮอร์โมนอินซูลิน : โมเลกุลของอินซูลินประกอบด้วยกรดอะมิโน 51 ตัว โครงสร้างของอินซูลินเป็นสายเปปไทด์ 2 สาย ได้แก่ สายเอ (chain A) และสายบี (chain B) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้โมเลกุลของอินซูลินมีลักษณะเป็นสายเกลียว (helix) สั้นๆ 3 สาย และสะพานไดซัลไฟด์ (disulphide bridges) 3 เส้น

รูปภาพจาก : <http://itech.dickinson.edu/chemistry/?cat=75>

ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้นหลังรับประทานอาหารสามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนได้ เนื่องจาก  $\beta$ -cell มีโปรตีนขนส่งกลูโคสแบบไม่ใช้พลังงาน (Facilitative glucose transporter) ชนิด glucose transporter 2 (GLUT2) อยู่บนผิวเซลล์ ทำให้กลูโคสในกระแสเลือดสามารถผ่านเข้าสู่  $\beta$ -cell เพื่อกระตุ้นกระบวนการภายในเซลล์ให้เกิดการหลั่งอินซูลินเข้าสู่กระแสเลือดด้วยวิธี exocytosis ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 การหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนอันเนื่องมาจากระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้น  
รูปภาพจาก : <http://www.gghjournal.com/volume22/4/ab06.cfm>

อินซูลินมีหน้าที่หลักในการรักษาสสมดุลของน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยก่อให้เกิดการตอบสนองของเซลล์หลายรูปแบบที่จะมีผลให้ระดับกลูโคสในเลือดลดลง ทั้งเร่งการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงาน เร่งการสังเคราะห์เก็บเป็นแหล่งพลังงานสำรองยามที่ร่างกายอดอาหาร หรือขณะออกกำลังกาย และลดการสลายพลังงานสำรองเหล่านั้น (ตารางที่ 2.1)

เป้าหมายหลักที่สำคัญของอินซูลินได้แก่ ตับ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมัน โดยอินซูลินจะมีบทบาทต่อการกระตุ้นกระบวนการไกลโคไลซิสของตับเพื่อสร้างพลังงานและเก็บเป็นสารชีวโมเลกุลรูปแบบอื่น ได้แก่ ไกลโคเจน ไตรกลีเซอไรด์ และโปรตีน ส่วนเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมัน จะเป็นส่วนสำคัญที่เพิ่มการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ผ่านโปรตีนขนส่งกลูโคสแบบไม่ใช้

พลังงาน (Facilitative glucose transporter) โดยการกระตุ้นของอินซูลินในรูปแบบสัญญาณต่อเนื่อง (Signal transduction) ผ่านตัวรับอินซูลินบนผิวเซลล์ (Insulin receptor) และโปรตีนตัวกลางต่างๆ ภายในเซลล์ [23, 24]

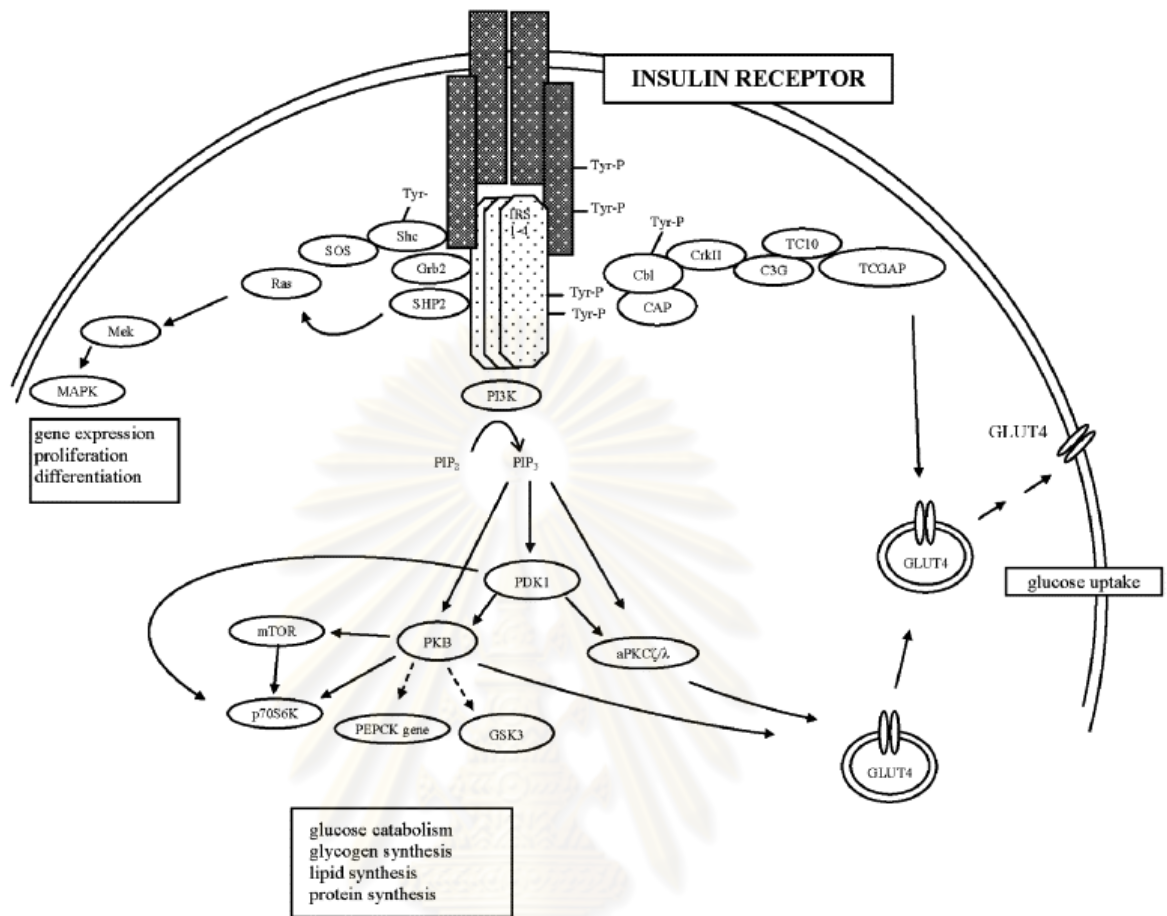
#### ตารางที่ 2.1 แสดงหน้าที่ของฮอร์โมนอินซูลิน

บทบาทต่อเมตาบอลิซึม	ฤทธิ์ของอินซูลิน	เซลล์เป้าหมาย
1. คาร์โบไฮเดรต	1.1 ลดการสังเคราะห์กลูโคสในเซลล์ โดย ยับยั้งกระบวนการ gluconeogenesis และ กระบวนการ glycogenolysis 1.2 เพิ่มการสังเคราะห์ไกลโคเจน (Glycogenesis) 1.3 เพิ่มการขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ โดยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนขนส่งกลูโคส บนผิวเซลล์	ตับ  ตับ, กล้ามเนื้อลาย กล้ามเนื้อลาย, เนื้อเยื่อไขมัน
2. ไขมัน	2.1 ลดการสลายไตรกลีเซอไรด์ (Lipolysis) 2.2 เพิ่มการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์	เนื้อเยื่อไขมัน ตับ, เนื้อเยื่อไขมัน
3. โปรตีน	3.1 เพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน	เซลล์อื่นๆ

#### 4. การส่งสัญญาณอินซูลิน (Insulin signaling pathway)

อินซูลินสามารถออกฤทธิ์ผ่านการส่งสัญญาณต่อเนื่องภายในเซลล์เป้าหมาย โดยการกระตุ้นของอินซูลินจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการภายในเซลล์ 3 ทาง (ภาพที่ 2.6) ดังนี้

- 1) กระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันภายในเซลล์ และการเคลื่อนตำแหน่งไปยังผิวเซลล์ของโปรตีนตัวขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ (Glucose transporter 4; GLUT4) ผ่านวิถี Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K-dependent pathway)
- 2) กระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์ (Cell proliferation and differentiation) ผ่านวิถี Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase pathway)
- 3) กระบวนการเคลื่อนตำแหน่งไปยังผิวเซลล์ของ GLUT4 ผ่านวิถี Cbl-associated protein/Cbl (CAP/Cbl pathway)



ภาพที่ 2.6 การกระตุ้นของอินซูลินผ่านการส่งสัญญาณภายในเซลล์ 3 ทาง : PI3K-dependent pathway (กลาง), MAP kinase pathway (ซ้าย) และ CAP/Cbl pathway (ขวา) [25]

อย่างไรก็ตาม วิธีการส่งสัญญาณหลักในการเมตาบอลิซึมของกลูโคส ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวาน โดยเฉพาะโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ได้แก่ PI3K-dependent pathway

### 5. การส่งสัญญาณอินซูลินผ่าน PI3K-dependent pathway

อินซูลินที่หลั่งจาก  $\beta$ -cells ของตับอ่อนจะไหลเวียนมาตามกระแสเลือด แล้วเข้าจับอย่างจำเพาะกับ insulin receptor ซึ่งเป็น tyrosine kinase receptor บนผิวเซลล์เป้าหมายที่ตอบสนองต่ออินซูลินตรงส่วนของ  $\alpha$ -subunit ก่อให้เกิด autophosphorylation ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน tyrosine หลายตำแหน่งบน  $\beta$ -subunit บริเวณผิวเซลล์ด้านใน ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการส่ง

สัญญาณต่อเนื่องในลักษณะของการเกิด phosphorylation ให้กับโปรตีนตัวส่งสัญญาณ (Signaling proteins) ภายในเซลล์ [26]

Insulin receptor substrate (IRS) เป็นโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินตัวแรก มีตั้งแต่ IRS-1 ถึง IRS-4 โดย IRS-1 จะมีบทบาทมากที่สุดต่อการส่งสัญญาณต่อเนื่องของอินซูลิน IRS-1 จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่กรดอะมิโนชนิด tyrosine และ serine หลายตำแหน่ง ซึ่งบางตำแหน่งจะเป็นที่จับของโปรตีนที่มีส่วนที่เรียกว่า src homology 2 (SH2) domain ทำให้ phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) ซึ่งเป็น SH2-protein ในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลิน สามารถเข้ามาจับอย่างจำเพาะกับ IRS-1 ได้ การจับกันดังกล่าวเป็นการกระตุ้นการทำงานของ PI3K ต่อไป

Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) เป็นโปรตีน kinase ตัวส่งสัญญาณที่มีความสำคัญ ถือเป็น second messenger ของกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลิน PI3K มีโครงสร้างที่แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ p85 regulatory subunit ที่จับอยู่กับ IRS-1 และ p110 catalytic subunit ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) ที่ตำแหน่ง D3 ของวงแหวน inositol เกิดเป็น phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) บริเวณผิวเซลล์ด้านใน ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการกระตุ้นการทำงานของ protein kinase B ต่อไป เนื่องจากโครงสร้างของ PIP<sub>3</sub> มีส่วนที่สามารถจับได้กับ pleckstrin homology (PH) domain ที่อยู่บนส่วนปลายอะมิโนของ protein kinase B

Protein kinase B (PKB) หรือที่รู้จักในชื่อ Akt เป็น serine/threonine kinase ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ (cell growth) การแบ่งตัวและอยู่รอดของเซลล์ (cell proliferation and survival) รวมถึงป้องกันการตายของเซลล์แบบ apoptosis นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ตัวกลางการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ในกระบวนการส่งสัญญาณจากการกระตุ้นของอินซูลินอีกด้วย Akt มี 3 isoforms ได้แก่ Akt-1, Akt-2 และ Akt-3 ตรงปลายอะมิโนของ Akt มีส่วน PH-domain สามารถจับได้กับ inositol lipids โดยเฉพาะ PIP<sub>3</sub> บริเวณผิวเซลล์ด้านใน กลไกการจับกันระหว่าง Akt และ PIP<sub>3</sub> นี้เป็นการเพิ่มโอกาสให้ส่วน kinase domain ของ Akt เข้าใกล้โปรตีน kinase ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น เพื่อกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Akt 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง threonine 308 (Thr308) ตรงส่วนกลาง catalytic domain ที่เรียกว่า activation loop หรือ T-loop และตำแหน่ง serine 473 (Ser473) ตรงส่วนปลาย carboxy ที่เรียกว่า hydrophobic motif หรือ H-motif โปรตีน kinase ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้ Akt ณ ตำแหน่ง Thr308 และ Ser473 ดังกล่าว คือ PDK1 และ PDK2 ตามลำดับ [27]

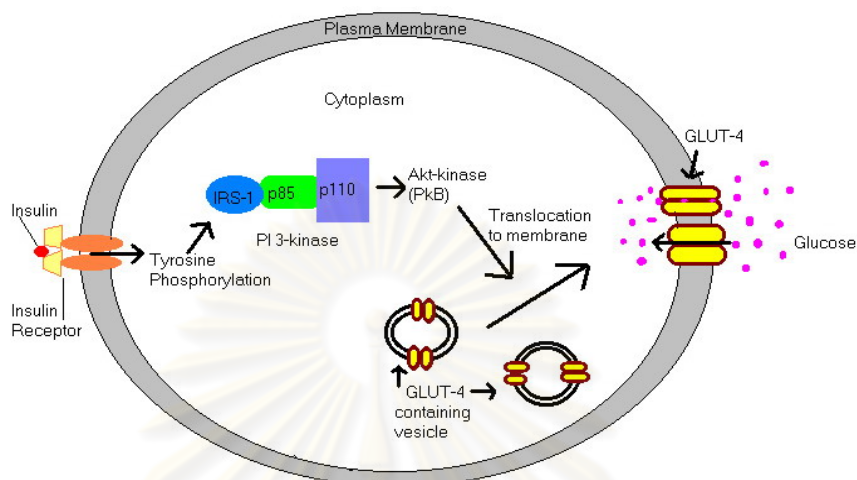
Phosphoinositide dependent protein kinase (PDK) เป็นอีกหนึ่งตัวกลางในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลิน ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง serine/threonine ของ Akt

และ atypical protein kinase C (aPKC) นอกจากนี้ PDK1 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ คือ เอนไซม์ p70 ribosomal S6 kinase (S6K) และ serum and glucocorticoid induced protein kinase (SGK) เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีทั้งส่วน T-loop และ H-motif คล้ายกับ Akt ซับสเตอร์พของ S6K ได้แก่ 1) Ribosomal S6 protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการแปลรหัสจาก mRNA เป็นโปรตีน การกระตุ้นการทำงานของ ribosomal S6 protein จึงเป็นการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์โปรตีนทางหนึ่ง 2) Elongation factor 2 kinase ทำงานในลักษณะที่ตรงข้ามกับ ribosomal S6 protein กล่าวคือ การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ elongation factor 2 kinase เป็นการยับยั้งไม่ให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตต่อไปยัง elongation factor 2 (EF2) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น elongation stage ในการสังเคราะห์โปรตีนได้ [28]

การกระตุ้นด้วยการเกิด phosphorylation อย่างต่อเนื่องผ่านทาง Akt ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของ glucose transporter 4 (GLUT4)-storage vesicles (GSVs) จากภายใน cytosol ไปที่ผิวเซลล์ แล้วหลอมรวมเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อปลดปล่อยให้โมเลกุลของ GLUT4 ทำหน้าที่เป็นช่องทางให้กลูโคสในกระแสเลือดสามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ [29] ดังแสดงในภาพที่ 2.7 จนกระทั่งน้ำตาลกลูโคสในเลือดอยู่ในระดับปกติ GLUT4 จึงจะถูกเรียกกลับเข้าสู่ cytosol ดังเดิมด้วยวิธี endocytosis โดยโปรตีนที่มีบทบาทในการรีไซเคิล GLUT4 ได้แก่ clathrin

นอกจากมีการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนตัวส่งสัญญาณภายในเซลล์แล้ว กระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินผ่าน PI3K-dependent pathway ยังมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลการทำงานของโปรตีนตัวส่งสัญญาณหรือเอนไซม์ kinase เพื่อยับยั้งไม่ให้เกิดการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์มากเกินไป ป้องกันการเกิดภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายได้ โปรตีนดังกล่าวได้แก่ SHP2 และ PTP1B ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิด phosphorylation ของ IRS ในขณะที่ pTEN ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ PI3K ด้วยสมดุลของกระบวนการทำงานและกระบวนการยับยั้งการทำงาน ทำให้การส่งสัญญาณอินซูลินเป็นไปอย่างปกติ โดยเซลล์สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลินในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้เข้าสู่ระดับปกติได้ ในทางตรงกันข้าม เมื่อใดที่เซลล์เกิดความบกพร่องในการส่งสัญญาณและการควบคุมดังกล่าวในระยะยาว ย่อมส่งผลให้เซลล์ดีต่อการตอบสนองต่ออินซูลิน หรือที่เรียกว่า insulin resistance [17,30] ทั้งนี้ ปัจจัยที่เป็นไปได้ อาทิ การแสดงออกของโปรตีนตัวส่งสัญญาณลดน้อยลง กระบวนการ phosphorylation ถูกขัดขวางด้วยปัจจัยบางประการ การแสดงออกที่มาก

เกิน (over expression) ของโปรตีนตัวยับยั้ง เป็นต้น ล้วนเป็นสาเหตุให้เกิดความบกพร่องในการส่งสัญญาณอินซูลินได้ทั้งสิ้น [25]



**ภาพที่ 2.7** การส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลินผ่าน insulin receptor ใน PI3K-dependent pathway

รูปภาพจาก : <http://student.biology.arizona.edu/honors2003/group05/bg.html>

## 6. ภาวะดื้ออินซูลิน

ภาวะดื้ออินซูลิน หรือ insulin resistance คือ ภาวะที่เซลล์มีความไวในการตอบสนองต่ออินซูลินลดลง ทำให้ความสามารถในการขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ลดลงด้วย ส่งผลให้กลูโคสคั่งสะสมในกระแสเลือดมากและยาวนานกว่าปกติ ในระยะเริ่มต้นระดับอินซูลินซึ่งเป็นแหล่งผลิตอินซูลินจะเร่งการสร้างและหลั่งอินซูลินออกสู่กระแสเลือด เพื่อกระตุ้นเซลล์เป้าหมายให้ตอบสนองมากขึ้น และพยายามรักษาน้ำตาลในเลือดให้ใกล้เคียงระดับปกติ ทำให้มีระดับอินซูลินในเลือดสูงร่วมด้วย [31] เนื้อเยื่อที่เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ได้แก่ เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับ glucose homeostasis ประกอบด้วย กล้ามเนื้อลาย เนื้อเยื่อไขมัน และตับ

ภาวะดื้ออินซูลินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย หรือ metabolic syndrome อาทิ โรคเบาหวานประเภทที่ 2 โรคอ้วน โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น

## 6.1 สาเหตุของภาวะดื้ออินซูลิน

ปัจจัยหลักๆที่ก่อให้เกิดภาวะ insulin resistance ที่ได้มีการศึกษามาแล้วได้แก่ ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงและความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินซูลินภายในเซลล์ ภาวะน้ำหนักเกินและไขมันในเลือดสูงซึ่งทำให้มีกรดไขมันสูงตามมา ระดับฮอร์โมนหรือสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อนุมูลอิสระและระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ปัจจัยทางพันธุกรรมก็มีส่วนส่งเสริมการเกิดภาวะดื้ออินซูลินได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม

### 6.1.1 ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงและความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินซูลินภายในเซลล์

ความผิดปกติของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลิน (Insulin signaling pathway) ที่ส่งผลให้การเคลื่อนย้าย GLUT4 ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีภาวะดื้ออินซูลิน เนื่องจากการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ลดลง [32]

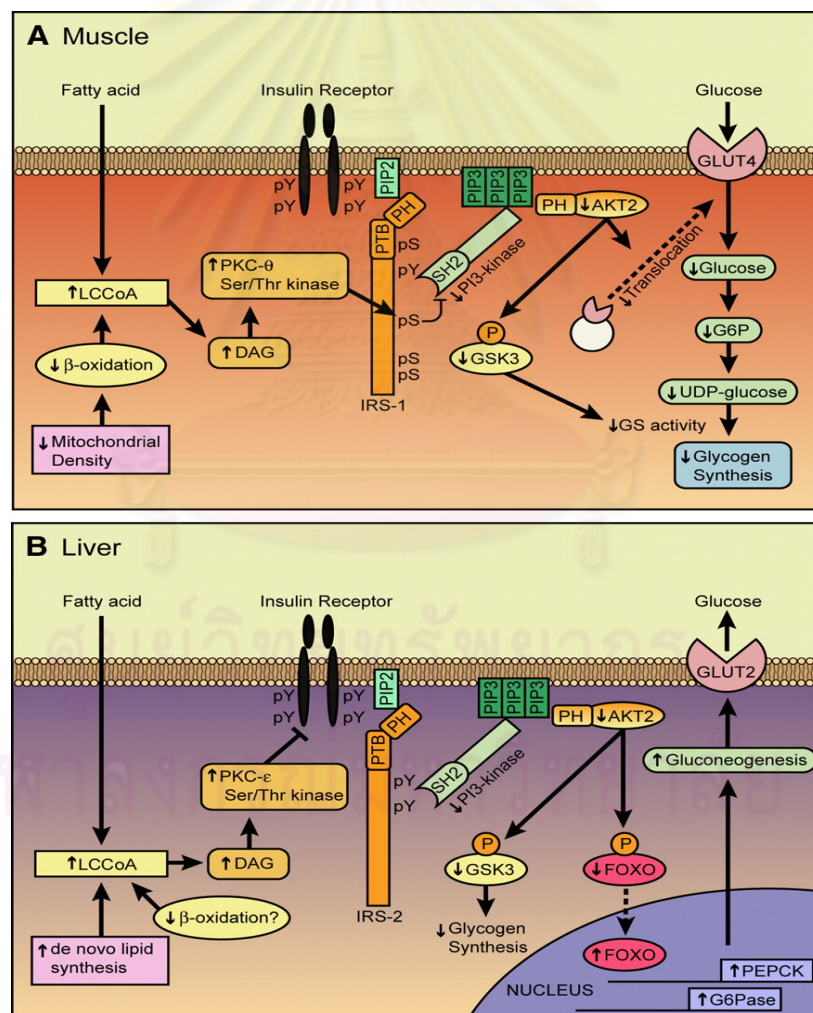
การศึกษาค้นคว้าของกรดไขมันอิสระ (free fatty acids; FFA) ต่อโมเลกุลที่มีบทบาทในการส่งสัญญาณของอินซูลิน (Insulin signaling molecules) โดย Yu และคณะ ในปี ค.ศ.2002 พบว่า FFA เพิ่มการเกิด phosphorylation ที่ตำแหน่ง serine ซึ่งเป็น inhibitory site บน IRS-1 ทำให้เกิดความบกพร่องในการกระตุ้นต่อไปยัง PI3K มีผลให้ความไวต่ออินซูลินของเซลล์กล้ามเนื้อลดลง [33] การศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อพบว่า FFA เพิ่มการสร้าง diacylglycerol ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ PKC $\theta$  ให้เติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง serine/threonine บน IRS-1 มีผลให้ PI3K ทำงานลดลง การขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง GLUT4 จึงลดลงด้วย [34] ในขณะที่ FFA เหนี่ยวนำให้ตับเพิ่มการสร้างกลูโคสผ่านกระบวนการ gluconeogenesis แล้วปลดปล่อยออกสู่กระแสเลือดทาง GLUT2 ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น [31] ดังแสดงในภาพที่ 2.8A และ 2.8B ตามลำดับ

### 6.1.2 ภาวะน้ำหนักเกินและไขมันในเลือดสูง

ผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ที่มีภาวะดื้ออินซูลิน นอกจากจะมีความผิดปกติในกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตแล้ว ยังพบว่าส่วนใหญ่มีความผิดปกติเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของไขมันร่วมด้วย [21] ร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วยมีน้ำหนักเกิน ในขณะที่คนปกติที่อ้วนพบว่ามีภาวะดื้ออินซูลินได้ ความอ้วนจึงเป็นปัจจัยเสี่ยงประการหนึ่งที่น่าไปสู่การเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 [35,36]



การศึกษาค้นคว้าจำนวนมากระบุว่า การได้รับไขมันในปริมาณสูงเป็นการเพิ่มระดับกรดไขมันอิสระ (FFA) ที่ไหลเวียนในกระแสเลือด สามารถส่งเสริมให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ โดยเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน [2,37] และเมื่อลดระดับ FFA ลง พบว่า ความไวต่ออินซูลินของเซลล์กล้ามเนื้อลาย และเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น [21] ผลของ FFA ต่อการเกิดภาวะดื้ออินซูลินส่วนหนึ่งมาจากการทำให้เกิดความบกพร่องโดยตรงต่อการส่งสัญญาณอินซูลินดังกล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตาม FFA ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอ้อม ผ่านทาง Transcription factor-signaling pathway ได้แก่ NF- $\kappa$ B pathway และ JNK pathway ส่งผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ proinflammatory cytokines เช่น IL-6, TNF- $\alpha$  เป็นต้น ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินได้เช่นกัน [38]



ภาพที่ 2.8 กลไกการเกิดภาวะดื้ออินซูลินอันเนื่องมาจากกรดไขมันอิสระผ่านกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ : (A) เซลล์กล้ามเนื้อ , (B) เซลล์ตับ [31]

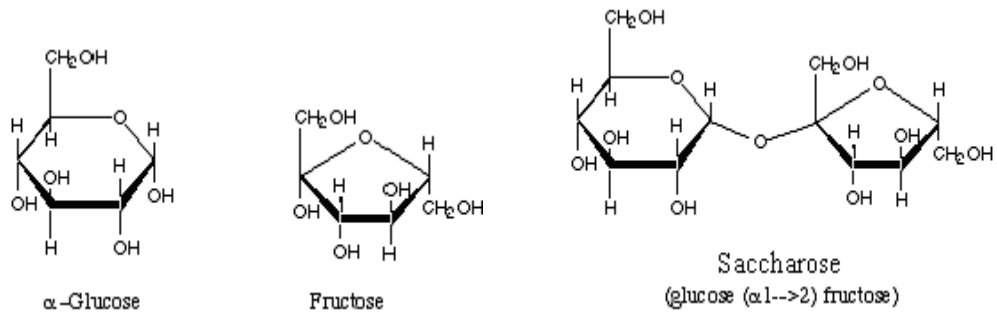
### 6.1.3 ระดับฮอร์โมนหรือสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

ระบบการตอบสนองต่อการอักเสบในร่างกายแบบเรื้อรัง อันได้แก่ การเปลี่ยนแปลงการผลิตและหลั่ง cytokine รวมถึงการกระตุ้นการส่งสัญญาณในกระบวนการอักเสบ มักเกิดขึ้นกับผู้ป่วยโรคอ้วน ซึ่งความอ้วนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะดื้ออินซูลิน ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ความผิดปกติในการตอบสนองต่อการอักเสบจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่น่าไปสู่การเกิดภาวะดื้ออินซูลินได้ [39] โดยส่วนใหญ่คนอ้วนจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ proinflammatory proteins อาทิ TNF- $\alpha$ , IL-6, nitric oxide synthase, C-reactive protein, ICAM และ monocyte chemotactic protein-1 เป็นต้น ในขณะที่ adipokine ที่ทำหน้าที่ด้านการอักเสบและการถูกทำลายของหลอดเลือดอย่าง adiponectin มีการแสดงออกที่ลดลง [40] จากการศึกษาพบว่าภาวะที่มี adiponectin ในเลือดต่ำ พบได้ทั้งในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจและโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ซึ่งมีภาวะดื้ออินซูลินร่วมด้วย [41] นอกจากนี้ การให้ adiponectin แก่หนูเบาหวานที่มีภาวะอ้วน พบว่าสามารถลดน้ำหนักตัว ลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน และลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูได้ [42]

การศึกษาเกี่ยวกับ Jun kinase 1 (JNK1) ซึ่งเป็นโปรตีนในกระบวนการอักเสบ ชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ ผ่านการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง inhibitory site ของ IRS-1 พบว่า มีการทำงานของ JNK1 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อไขมันของหนูและของคนที่มีภาวะอ้วน ในทางตรงกันข้าม พบว่าหนูที่ถูกกวดการแสดงออกของ JNK1 สามารถเพิ่มความไวของเซลล์ต่ออินซูลินได้ดียิ่งขึ้น [43]

## 7. น้ำตาลฟรุกโตส

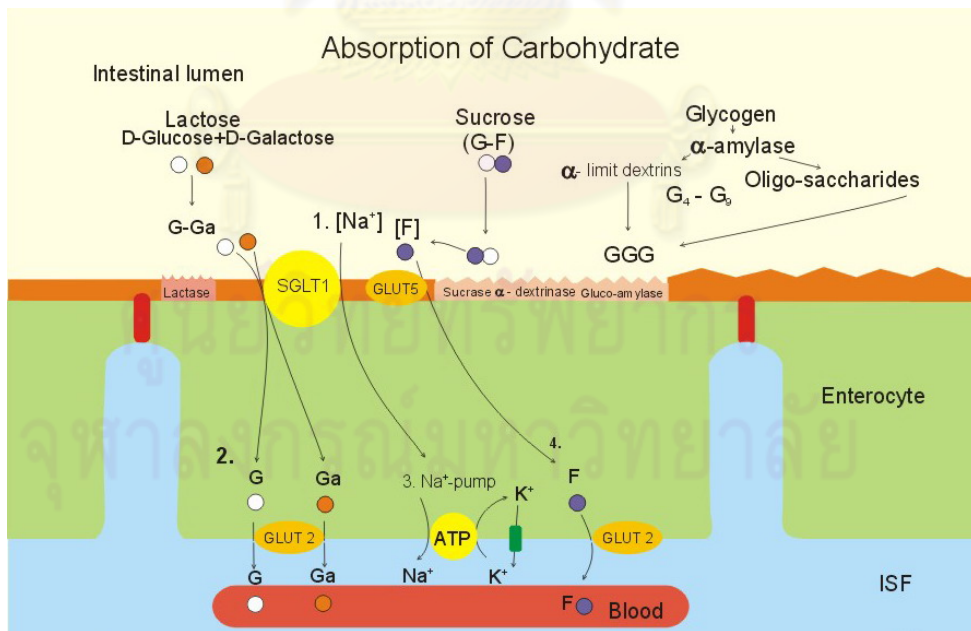
ฟรุกโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) เช่นเดียวกับกลูโคส และกาแลกโตส เป็นส่วนประกอบที่ให้ความหวานตามธรรมชาติของพืชผักผลไม้ ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและซูโครสในสัดส่วนที่แตกต่างกันออกไป หากเปรียบเทียบความหวานของน้ำตาลซูโครสเป็น 100% น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสจะหวานเป็น 73% และ 173% ตามลำดับเมื่อเทียบกับความหวานของน้ำตาลซูโครส จึงมักมีการนำน้ำตาลฟรุกโตสมาใช้ให้ความหวานแทนน้ำตาลทรายหรือน้ำตาลซูโครส เนื่องจากใช้ปริมาณน้อยกว่าในการให้ความหวานที่เท่ากัน



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส  
 รูปภาพจาก : <http://www.food-info.net/uk/products/sugar/chemistry.htm>

### 7.1 เมตาบอลิซึมของน้ำตาลฟรุคโตส

ร่างกายสามารถดูดซึมน้ำตาลฟรุคโตสจากลำไส้เล็กส่วนต้น เข้าสู่เซลล์ผนังลำไส้ (Epithelium cell) ผ่านโปรตีนขนส่งกลูโคสแบบไม่ใช้พลังงานชนิด glucose transporter 5 (GLUT5) ทางด้าน brush-border membran แล้วผ่าน glucose transporter 2 (GLUT2) เข้าสู่กระแสเลือดทางด้าน baso-lateral membrane ดังแสดงในภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 การดูดซึมน้ำตาลฟรุคโตส : หลังจากน้ำตาลซูโครสถูกย่อยในลำไส้เล็กส่วนต้น แยกตัวเป็นน้ำตาลกลูโคส (G;กลมขาว) และฟรุคโตส (F;กลมม่วง) จากนั้นน้ำตาลกลูโคสจะถูกดูดซึมเข้าสู่ epithelium cell พร้อมกับโซเดียม (Na<sup>+</sup>) เรียกว่า Sodium-glucose co-transporter

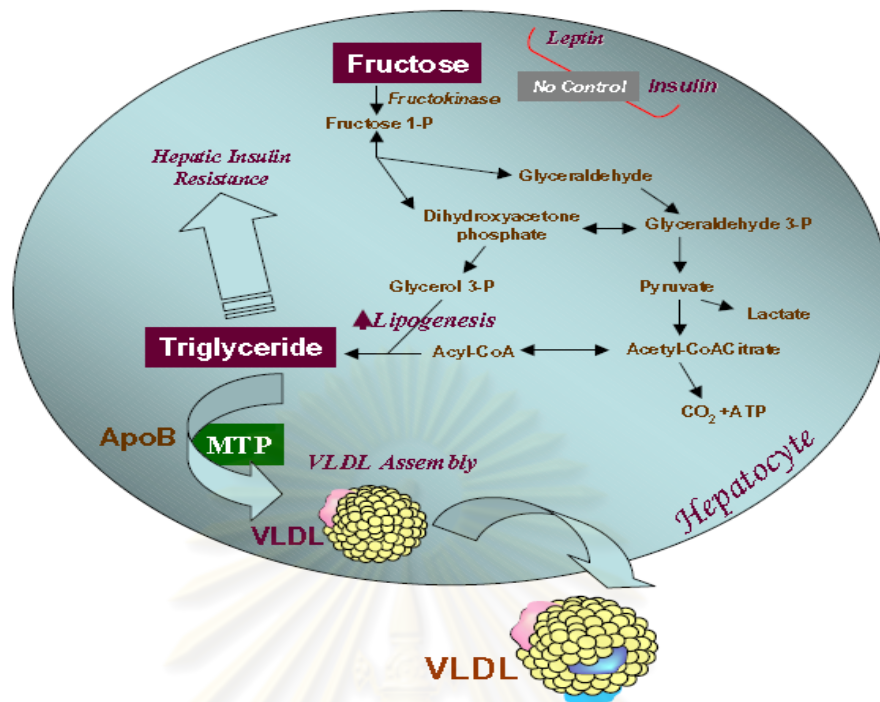
หรือ SGLT1 ในขณะที่น้ำตาลฟรุกโตสถูกดูดซึมเข้าสู่ epithelium cell ผ่าน GLUT5 และเข้าสู่กระแสเลือดผ่านทาง GLUT2 เช่นเดียวกับน้ำตาลกลูโคส

รูปภาพจาก : <http://www.mfi.ku.dk/PPaulev/chapter23/kap%2023.htm>

หลังจากถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้ว โมเลกุลของฟรุกโตสจะถูกลำเลียงไปยังตับ [44] และผ่าน GLUT2 บนผิวเซลล์ตับโดยไม่ต้องอาศัยฤทธิ์ของอินซูลิน เพื่อเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ตับต่อไป

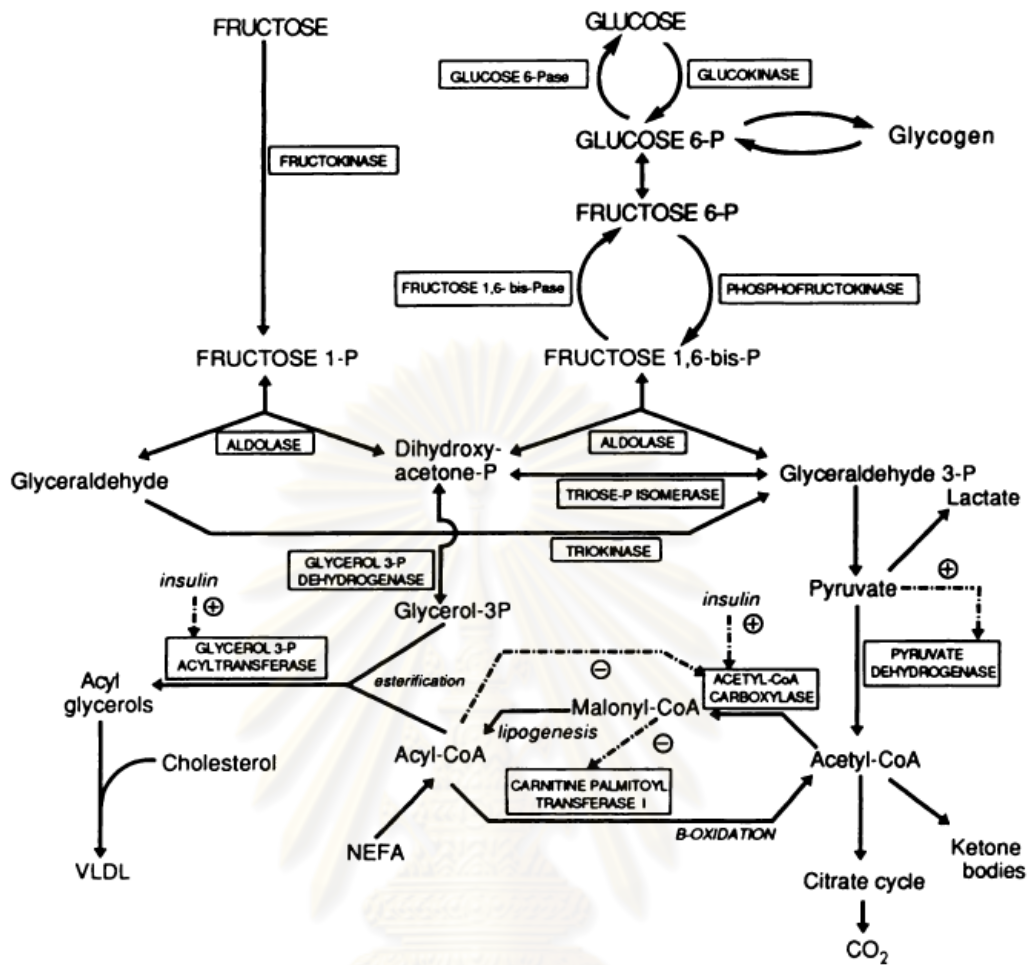
ภายในเซลล์ตับ ฟรุกโตสจะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง C-1 กลายเป็น fructose-1-phosphate ด้วยเอนไซม์ fructokinase จากนั้นเอนไซม์ aldolase B จะเปลี่ยน fructose-1-phosphate ให้เป็น glyceraldehyde และ dihydroxyacetone phosphate (DHAP) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากเมตาบอลิซึมของฟรุกโตสทั้งสองชนิดนี้ สามารถถูกเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphate (GA-3-P) ด้วยเอนไซม์ triokinase และ triosephosphate isomerase ตามลำดับ ก่อนลัดเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิสในขั้นตอน triose phosphate เพื่อสังเคราะห์เป็น pyruvate โดยไม่ต้องผ่าน rate-limiting step ของกระบวนการไกลโคไลซิส [18, 44] ทำให้บางส่วนของฟรุกโตสถูกสร้างเป็น pyruvate ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งนอกจากเป็นการเพิ่มการสร้าง lactate และ ATP แล้ว ยังส่งผลให้ปริมาณ acyl-Co A เพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกันเซลล์สามารถเปลี่ยน DHAP เป็น glycerol-3-phosphate เพื่อสังเคราะห์ไขมันภายในเซลล์ร่วมกับ acyl-Co A ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไตรกลีเซอไรด์สะสมในเซลล์ตับ [45] และสามารถขนส่งออกจากเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือดในรูปแบบของ very low density lipoprotein (VLDL) [18] ดังแสดงในภาพที่ 2.11 และ 2.12

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.11 เมตาบอลิซึมของน้ำตาลฟรุกโตสในเซลล์ตับ [30]

VLDL จากตับที่ลำเลียงผ่านกระแสเลือดจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ lipoprotein lipase (LPL) ก่อนเข้าสู่เซลล์ไขมันเพื่อสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์เก็บสำรองไว้ ไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ไขมันสามารถผ่านกระบวนการสลายไขมัน (Lipolysis) ให้กรดไขมันอิสระ (FFA) แล้วปลดปล่อยออกสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะอื่น อาทิ กล้ามเนื้อลายได้ [19] การศึกษาจำนวนไม่น้อยที่แสดงให้เห็นว่า FFA เป็นสาเหตุหนึ่งที่ส่งเสริมการเกิดภาวะดื้ออินซูลิน [46] เนื่องจาก FFA ที่ผ่านเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อลาย สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ ส่งผลให้ความไวของเซลล์ต่ออินซูลินลดลง



ภาพที่ 2.12 จุดบรรจบกันของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของฟรุกโตสและไกลโคไลซิสของกลูโคสในเซลล์ตับ : เอนไซม์ aldolase ในเซลล์ตับ (aldolase B) เร่งปฏิกิริยาให้กับขั้นตอนที่ 2 ชนิด ได้แก่ fructose-1-P ใน fructose pathway (ซ้าย) และ fructose-1,6-bis-P ใน glycolysis (ขวา) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก fructose-1-P คือ glyceraldehyde และ dihydroxyacetone phosphate สามารถถูกเปลี่ยนด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันเกิดเป็น glyceraldehyde-3-P ซึ่งส่วนหนึ่งได้มาจาก fructose-1,6-bis-P ในกระบวนการไกลโคไลซิส [18]

นอกจากฟรุกโตสจะมีส่วนส่งเสริมการสร้างพลังงานจากการสลายกลูโคสในกระบวนการไกลโคไลซิสแล้ว สารสำคัญที่ได้จากเมตาบอลิซึมของฟรุกโตสดังได้กล่าวข้างต้น ยังเป็นตัวกลางของกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมตาบอลิซึมของทั้งกลูโคสและไขมันภายในเซลล์หลายกระบวนการ ทั้งกระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจน (Glycogenesis) กระบวนการสังเคราะห์กลูโคสจากแหล่งอื่น (Gluconeogenesis) และกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน (Lipogenesis) ถือได้ว่าฟรุกโตสส่งเสริมการสังเคราะห์กลูโคส ไกลโคเจน และไขมันในเซลล์ตับได้

ข้อแตกต่างระหว่างเมตาบอลิซึมของฟรุกโตสและกลูโคสได้แก่ ฟรุกโตสสามารถถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ได้ตลอด โดยไม่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับระดับเอนไซม์ phosphofructokinase-1 ทำให้ฟรุกโตสถูกเมตาบอลิซึมได้อย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ในขณะที่เมตาบอลิซึมของกลูโคสมีทั้งกระบวนการกระตุ้นและยับยั้งที่ต้องขึ้นอยู่กับระดับ rate-limiting enzyme ชนิดนี้ ฟรุกโตสจึงเป็นเสมือนแหล่ง acetyl-Co A ที่ไม่อาจควบคุมได้ การรับประทานฟรุกโตสจึงเพิ่มอัตราการเกิด de novo lipogenesis ในเซลล์ตับ เนื่องจากสามารถให้อะตอมคาร์บอนกับทั้งกลีเซอรอล และ acyl portion ของไตรกลีเซอไรด์ อย่างไรก็ตาม ฟรุกโตสไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของอินซูลิน หรือเลปติน (Leptin) ได้อย่างกลูโคส

## 7.2 บทบาทของน้ำตาลฟรุกโตสต่อการเกิดภาวะดื้ออินซูลิน

เป็นความจริงที่ว่าภาวะดื้ออินซูลินเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาจำนวนไม่น้อยที่แสดงให้เห็นว่า การรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณสูงติดต่อกันเป็นระยะเวลาเวลานาน (Long-term feeding) มีส่วนส่งเสริมให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินได้อีกทาง [9] ทั้งนี้เนื่องจาก ฟรุกโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ร่างกายสามารถดูดซึมและเมตาบอลิซึมได้อย่างรวดเร็วที่ตับ เมื่อตับได้รับฟรุกโตสในปริมาณมาก ติดต่อกันเป็นเวลานาน จะกระตุ้นการสังเคราะห์ไขมันที่เซลล์ (Lipogenesis) เกิดการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ และยังเป็นการเพิ่มการสังเคราะห์ไลโปโปรตีนชนิด very low density lipoprotein หรือ VLDL จากเซลล์ตับออกสู่กระแสเลือด (ภาพที่ 2.11) ส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์กรดไขมันอิสระมากขึ้น เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความไวของเซลล์ต่ออินซูลินลดลง [46] ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำน้ำตาลฟรุกโตสมาใช้เป็นตัวกระตุ้นการเกิดภาวะดื้ออินซูลินในงานวิจัยเป็นจำนวนมาก [30]

Blakely และคณะ ได้ทำการศึกษาลระยะยาว (Long-term effects) จากการให้อาหารที่มีส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 54 ของน้ำหนักอาหารแก่หนูทดลอง โดยร้อยละ 15 ของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดมาจากฟรุกโตส โดยใช้วิธี Oral glucose tolerance test (OGTT) ในการประเมินภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง พบว่า หลังจากได้รับอาหารเป็นเวลา 7 เดือน ระดับกลูโคสและอินซูลินในเลือดหนูทดลองขณะอดอาหาร และหลังจากได้รับกลูโคสทางปาก (250 mg/100g ของน้ำหนักตัว) เป็นเวลา 30 นาที 1, 2 และ 3 ชั่วโมง มีระดับสูงขึ้นกว่าระดับกลูโคสและอินซูลินในเลือดของหนูทดลองที่ไม่ได้รับฟรุกโตสร้อยละ 15 ของอาหารอย่างมีนัยสำคัญ [13]

การศึกษาในสุนัขพบว่า การให้อาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงร้อยละ 60 ของปริมาณแคลอรี ทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์และอินซูลินในเลือดของสุนัขขณะอดอาหารเพิ่มขึ้น

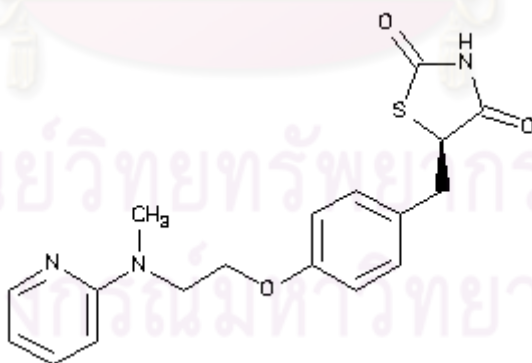
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการให้อาหาร 25 วัน ทั้งยังเพิ่มความดันในเลือดอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการให้อาหาร 28 วัน เมื่อเทียบกับสุนัขที่ได้รับอาหารมาตรฐาน [14]

รายงานเกี่ยวกับผลของน้ำตาลฟรุกโตสต่อโปรตีนในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตส ร้อยละ 66 ของอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า การแสดงออกของ insulin receptor ที่ตับและเซลล์กล้ามเนื้อทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารมาตรฐาน [17] นอกจากนี้ การได้รับน้ำตาลฟรุกโตสติดต่อกันนาน 28 วัน ส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการส่งสัญญาณอินซูลินในช่วงต้น กล่าวคือ มีการลดลงของระดับการเติมหมู่ฟอสเฟตของ insulin receptor (autophosphorylation) ที่เซลล์ตับถึงร้อยละ 72 รวมถึงของ insulin receptor substrate ที่เซลล์ตับและกล้ามเนื้อของหนูอย่างมีนัยสำคัญ [15]

## 8. ยารักษาโรคเบาหวาน Rosiglitazone

### 8.1 รายละเอียดตัวยา

ยา Rosiglitazone หรือ Rosiglitazone maleate มีชื่อทางการค้าว่า Avandia® เป็นยารักษาโรคเบาหวาน (anti-diabetic drug) ในกลุ่ม thiazolidinediones (TZDs) สามารถใช้ได้เดี่ยวหรือร่วมกับยารักษาโรคเบาหวานชนิดอื่น อาทิ metformin, sulfonylurea หรือ glimepiride เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2 เนื่องจากเป็นตัวยามีฤทธิ์เพิ่มความไวของอินซูลิน หรือ insulin sensitizer



ภาพที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของ Rosiglitazone : สูตรโครงสร้าง 5-[[4-[2-(methylpyridin-2-ylamino)ethoxy]phenyl]methyl]-1,3-thiazolidine-2,4-dione น้ำหนักโมเลกุล 357.43 g/mol รูปภาพจาก : <http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA451283>



## 8.2 สรรพคุณและข้อบ่งชี้การใช้ยา

เป็นยารับประทาน เพื่อลดภาวะดื้ออินซูลินในผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 ขนาดยาที่ใช้คือ 2-8 มิลลิกรัมต่อวัน โดยรับประทานครั้งเดียวหรือแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง ระยะเวลาในการเริ่มออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและอินซูลินประมาณ 1-4 สัปดาห์ และมักเกิดการตอบสนองสูงสุดหลังจากใช้ยาไปแล้วประมาณ 6-8 สัปดาห์

## 8.3 เมตาบอลิซึมของยา

หลังจากดูดซึม ร้อยละ 99.8 ของโมเลกุลยาจะถูกจับและลำเลียงโดยอัลบูมินในกระแสเลือด ระดับยาในกระแสเลือดสูงสุดประมาณ 1 ชั่วโมงหลังรับประทานยา และมีค่าครึ่งชีวิต 3-4 ชั่วโมง ยาจะถูกเมตาบอลิซึมที่ตับด้วยการปฏิกิริยา N-demethylation, hydroxylation และ conjugation กับ sulfate และ glucuronic acid และถูกขับออกทางปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่

## 8.4 การออกฤทธิ์ของยา

ออกฤทธิ์เช่นเดียวกับตัวยาในกลุ่ม TZDs ตัวอื่นๆ โดยการกระตุ้นผ่าน nuclear receptor ในกลุ่ม peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) โดยเฉพาะชนิด PPAR $\gamma$  ซึ่งพบบนเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเนื้อเยื่อไขมันมากกว่าตับ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่ออื่นๆ โดย Rosiglitazone จะเข้าจับกับ PPAR $\gamma$  บริเวณ ligand binding ก่อให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลิน (Insulin-responsive genes) ผ่านกระบวนการ transcription ช่วยส่งเสริมการออกฤทธิ์ของอินซูลินได้ นอกจากนี้ การจับกันระหว่าง Rosiglitazone และ PPAR $\gamma$  ยังส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบใน nuclear factor - kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway โดยลดปริมาณ NF- $\kappa$ B และเพิ่มปริมาณตัวยับยั้ง (IkB) จึงช่วยลดปฏิกิริยาการเกิดกระบวนการอักเสบต่อเนื้อเยื่อต่างๆ ภายในร่างกายได้

## 8.5 ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น

การใช้ยาดังกล่าวไม่จำเป็นการใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกับยาตัวอื่น อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์บางประการ อาทิ อาการปวดหัว ปวดหลัง อ่อนเพลีย ท้องเสีย ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) น้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้น บางรายอาจเกิดอาการบวมน้ำ (fluid retention) นำไปสู่ภาวะหัวใจล้มเหลว (congestive heart failure) [16] นอกจากนี้ยังมีส่วนเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในตับซึ่งอาจก่อให้เกิดภาวะตับอักเสบได้อีกด้วย [47]

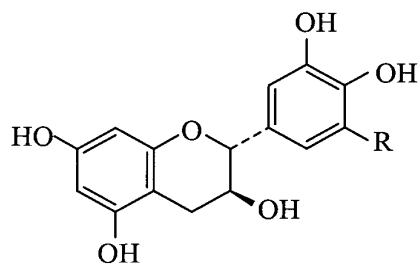
## 9. สารโพลีฟีนอล (Polyphenols)

โพลีฟีนอลเป็นกลุ่มของสารประกอบทางชีวภาพที่ได้จากผักและผลไม้ อาทิ ผลไม้จำพวกเบอร์รี่ องุ่น ชา [48] กาแฟ โกโก้ [49] ทับทิม ถั่วลิสง ผักใบเขียวบางประเภท เป็นต้น มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) สร้างพันธะอยู่โดยรอบ เมื่อเกิดการจับกับอนุมูลอิสระ (free radical) ทำให้สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ

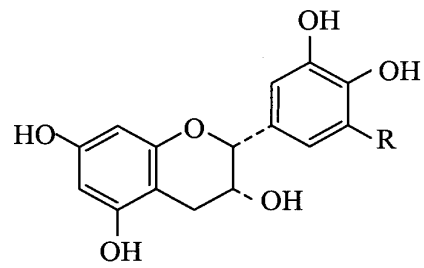
สารชีวภาพที่จัดอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล ได้แก่ กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

## 10. สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract)

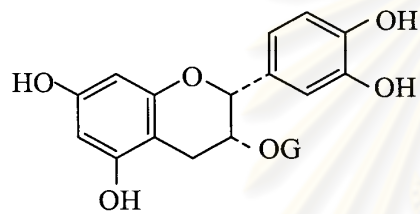
ชาวตะวันตกดื่มไวน์มาเป็นเวลานาน จนกระทั่งมีการศึกษาทางระบาดวิทยาที่แสดงให้เห็นว่า การรับประทานผักและผลไม้สดวันละ 5-7 อย่าง พร้อมกับไวน์แดงอีก 2 แก้ว ช่วยให้มีความสุขภาพที่ดีและมีอายุที่ยืนยาวขึ้น การศึกษาประโยชน์ของไวน์องุ่นจึงมีสืบเนื่องเรื่อยมา จนเป็นที่ทราบกันว่า องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์แดง หรือ *Vitis vinifera* Linn. อุดมไปด้วยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เรียกว่า สารโพลีฟีนอล ทั้งในกลุ่มกรดฟีนอลิก (Phenolic acids) ได้แก่ cinnamic acid, benzoic acid และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ได้แก่ colorless flavan-3-ols, colored flavanones, red and blue anthocyanins (ภาพที่ 2.14) ในปริมาณที่แตกต่างกันไปในแต่ละส่วนของผลองุ่น และที่สำคัญไปกว่านั้นคือการค้นพบว่า ในเมล็ดองุ่นมีปริมาณสารในกลุ่มโพลีฟีนอลดังกล่าวมากกว่าในเนื้อองุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ประมาณ 2-3 เท่า กล่าวคือ ร้อยละ 60-70 ของสารโพลีฟีนอลในองุ่นจะพบที่เมล็ด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ชนิดโปรแอนโทไซยานิน (Proanthocyanidin) [50] ที่มักพบในรูปโอลิโกเมอร์โปรแอนโทไซยานิน (Oligomeric proanthocyanidin; OPC) [51,52] ดังแสดงในภาพที่ 2.15



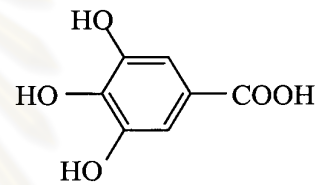
R = H: (+) -Catechin  
R = OH: (+) -Gallocatechin



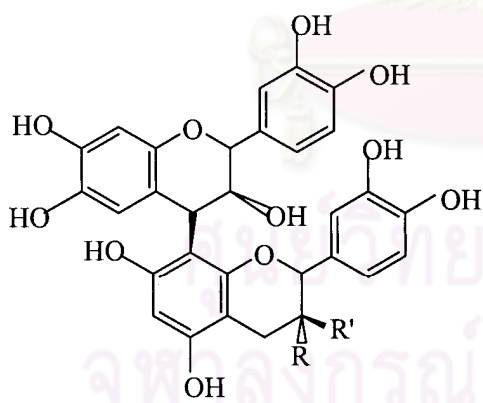
R = H: (-) -Epicatechin  
R = OH: (-) -Epigallocatechin



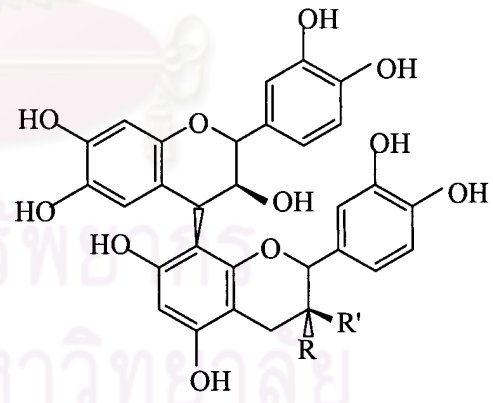
Epicatechin-3-gallate  
G = Gallic acid



Gallic acid

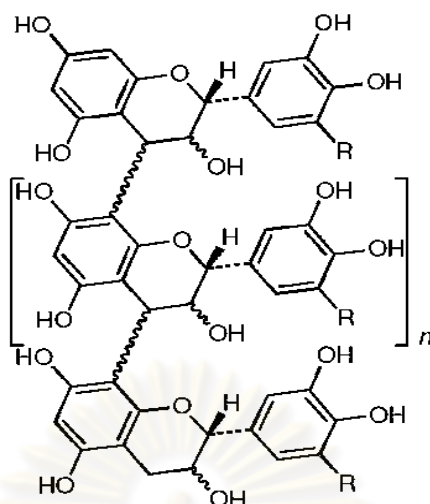


Procyanidin B1: R' = OH, R = H  
Procyanidin B2: R' = H, R = OH



Procyanidin B3: R' = OH, R = H  
Procyanidin B4: R' = H, R = OH

ภาพที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มโพลีฟีนอลที่พบมากในเมล็ดดองุ่น [50]



**ภาพที่ 2.15** โครงสร้างทางเคมีของ Proanthocyanidin : โดยทั่วไปอาจเรียกว่า Procyanidin เป็นโพลิเมอร์ของสาร flavan-3-ols ในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ catechin และ epicatechin มีการเรียงตัวของโมโนเมอร์ได้ตั้งแต่ 2 ตัว(dimer) 3 ตัว(trimer) 4 ตัว(tetramer) และ 5 ตัว(pentamer) รูปภาพจาก : <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/14.html>

### 10.1 การศึกษาความเป็นพิษและความปลอดภัยของการใช้สารสกัดเมล็ดองุ่น

Yamakoshi และคณะ ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยการป้อนสารสกัดเมล็ดองุ่น ขนาด 2 และ 4 g/kg ครั้งเดียวให้กับหนูขาวแต่ละกลุ่ม หลังจากสังเกตผลเป็นเวลา 14 วัน ไม่พบอาการเป็นพิษ และสิ่งผิดปกติใดๆเกิดขึ้นกับหนูทดลอง [53] นอกจากนี้ Yamakoshi ยังได้ทำการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดองุ่นโดยใช้ขนาด 0.02, 0.2 และ 2 % (w/w) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Bentivegna ที่ใช้ขนาด 0.63, 1.25 และ 2.5 % (w/w) กล่าวคือ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ค่าทางโลหิตวิทยา พยาธิวิทยาคลินิก หรือจุลพยาธิสภาพของอวัยวะภายในที่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ให้ ระหว่างหนูที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นร่วมกับอาหารมาตรฐานกับหนูที่ได้รับอาหารมาตรฐานเพียงอย่างเดียวต่อเนื่องกันเป็นเวลา 90 วัน [54] นอกจากนี้ การศึกษาความปลอดภัยและความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดองุ่นจากการกินและการสัมผัสหรือทาที่ผิวหนัง พบว่ามีค่า LD<sub>50</sub> มากกว่า 5000 mg/kg และมากกว่า 2000 mg/kg ของน้ำหนักตัวหนู ตามลำดับ [10]

## 10.2 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเมล็ดองุ่น

มีการศึกษาจำนวนมากไม่น้อยที่แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นซึ่งมีสารฟลาโวนอยด์ชนิดโปรแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูง เป็นสารทางชีวภาพชนิดใหม่อีกชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและให้ประโยชน์ในเชิงรักษาทางการแพทย์ที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง ฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ [10,55] ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง อาทิ เพิ่มกระบวนการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง [56] ลดผลกระทบทางลบที่เกิดจากการใช้ยาต้านมะเร็งในเซลล์ตับ [57] เป็นต้น ดังได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.2 และ 2.3 ทั้งนี้ มีการศึกษาจำนวนหนึ่ง ที่เสนอแนะแนวทางการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นเกี่ยวกับโรคเบาหวานโดยสัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระ การลดระดับไขมันและการลดระดับน้ำตาลในเลือด

**ตารางที่ 2.2** แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเมล็ดองุ่น (GSE) ในบทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่น	แบบจำลอง	ผู้ศึกษา
กำจัดอนุมูลอิสระ	In vitro	Bagchi <i>et al.</i> 1997 [58]
	In vitro	Ahn <i>et al.</i> 2002 [59]
	Platelets	Vitseva <i>et al.</i> 2005 [60]
ป้องกันความเสียหายของเซลล์อื่น เนื่องมาจาก H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Macrophage J774A.1 cells และ PC-12 adrenal pheochromocytoma cells	Bagchi <i>et al.</i> 1998 [61]
ยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation	Rats	Ahn <i>et al.</i> 2002 [59]
	Neonatal rats	Feng <i>et al.</i> 2005 [62]
	X-radiation-exposed rats	Enginar <i>et al.</i> 2007 [63]
ลดภาวะ Hypoxic ischemic brain injury	Neonatal rats	Feng <i>et al.</i> 2005 [62]
เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูล อิสระ	HepG2 cells	Puiggròs <i>et al.</i> 2005 [64]
ป้องกัน DNA ถูกทำลายจากปฏิกิริยา ออกซิเดชัน	Rats	Morin <i>et al.</i> 2008 [65]
ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันใน เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte	Human lymphocytes	Stanković <i>et al.</i> 2008 [66]

**ตารางที่ 2.3** แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเมล็ดดองุ่น (GSE) ในบทบาทอื่นๆ

ฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดดองุ่น	แบบจำลอง	ผู้ศึกษา
ป้องกันแผลในกระเพาะอาหาร	Rats	Saito <i>et al.</i> 1998 [67]
ป้องกันไต	Mice	Ray <i>et al.</i> 1998 [68]
ลดผลเสียจากการรักษาด้วย Chemotherapy	Chang liver cells	Joshi <i>et al.</i> 2000 [57]
ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Jayaprakasha <i>et al.</i> 2003 [69]
ป้องกันหัวใจ	Rats	Sato <i>et al.</i> 2001 [70]
	Rats	Karthikeyan <i>et al.</i> 2007 [71]
	Cardiac H9C2 cells	Du <i>et al.</i> 2007 [72]
เพิ่มการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง	Colon cancer CaCo2 และ NCM460 cells	Engelbrecht <i>et al.</i> 2007 [56]
ยับยั้งกระบวนการอักเสบ	Rats	Terra <i>et al.</i> 2009 [55]
ลดระดับน้ำตาลในเลือด	Rats, L6E9 myotubes และ 3T3-L1 adipocytes	Pinent <i>et al.</i> 2004 [11]
	Rats	El-Alfy <i>et al.</i> 2005 [12]

### 10.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดดองุ่นในการต้านอนุมูลอิสระและลดระดับน้ำตาลในเลือด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดดองุ่นเทียบกับวิตามินซีและอี โดย Bagchi และคณะ ในปี ค.ศ.1997 พบว่า สารสกัดโพลีฟีนอลจากเมล็ดดองุ่นมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^-$ ) และอนุมูลไฮดรอกซี ( $\cdot OH$ ) สูงกว่าวิตามินซี 20 เท่า และสูงกว่าวิตามินอีถึง 50 เท่า [58] จากประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวส่งผลให้ทั่วโลกหันความสนใจมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมล็ดดองุ่นเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

ต่อมาในปี ค.ศ.1999 Koga และคณะได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดดองุ่นในหนูขาว โดยวัดความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในพลาสมา โดยมี copper sulfate หรือ 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorid (AAPH) เป็นตัว

ออกซิไดส์ หลังจากที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นความเข้มข้น 250 mg/kg เพียงครั้งเดียว พบว่า ในพลาสมาของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นมีการต้านการรวมตัวของ cholesteryl ester hydroperoxides (CE-OOH) มากกว่าในพลาสมาของหนูขาวในกลุ่มควบคุม และมีระยะพักในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันยาวนานขึ้น ซึ่งการได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่น สามารถเพิ่มความต้านทานต่อ oxidative stress ได้ [73]

นอกจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางแล้ว การศึกษาของ Pinent และคณะ ปี ค.ศ.2004 ยังแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin ในลักษณะที่แปรผันตามปริมาณที่ให้ (dose dependent) รวมถึงความสามารถในการกระตุ้นการนำกลูโคสกลับเข้าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด L6E9 myotubes และ 3T3-L1 adipocytes เสมือนการออกฤทธิ์ของอินซูลิน [11] และจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการป้องกันเซลล์ตับอ่อนจากการทำลายของอนุมูลอิสระในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย alloxan ของ El-Alfy และคณะ ในอีก 1 ปีต่อมา พบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นขนาด 50 และ 100 mg/kg สามารถป้องกันความเสียหายของตับอ่อนจากอนุมูลอิสระ เพิ่มระดับกลูตาไธโอน และยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในตับอ่อนของหนูขาวได้ โดยผลจากการลดความเสียหายของตับอ่อนจากอนุมูลอิสระนี้ สามารถรักษาระดับฮอร์โมนอินซูลินให้ใกล้เคียงกับภาวะปกติ และส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานลดลง [12]

จากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมา ยังไม่มีการศึกษาใดที่ศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการลดภาวะดื้ออินซูลินผ่านกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ ทั้งที่ภาวะดื้ออินซูลินเป็นพยาธิสภาพหลักของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และความบกพร่องอย่างใดอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นต่อกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์ก็เป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เซลล์ไม่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลินเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพเพียงพอ การขาดหายของข้อมูลนี้จึงทำให้ยังไม่สามารถตอบคำถามเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่มีต่อกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินได้อย่างชัดเจน การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณอินซูลิน อันส่งผลต่อความไวในการตอบสนองของเซลล์ต่ออินซูลินในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินจากการได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง โดยใช้เทคนิค Western blot ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในเซลล์เป้าหมายที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลินของหนูขาวที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงระหว่างกลุ่มที่

เสริมและไม่เสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น ซึ่งการศึกษาดังกล่าวจะสามารถนำมาอธิบายถึงความเชื่อมโยงกับการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้ เพื่อให้ภาพต่อของการออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในเชิงป้องกันของสารสกัดเมล็ดองุ่นมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 1. น้ำยาและสารเคมี

รายการ	ยี่ห้อ/บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
1.1 PGO enzyme preparation	Sigma-Aldrich, USA
1.2 o-Dianisidine dihydrochloride	Sigma-Aldrich, USA
1.3 Rat insulin enzyme immunoassay kit	SPI-Bio/Cayman Chemical, USA
1.4 Cholesterol liquicolor kit	Human, Germany
1.5 Triglycerides liquicolor kit	Human, Germany
1.6 HDL cholesterol kit	Human, Germany
1.7 Rosiglitazone	Avandia <sup>®</sup> /GlaxoSmithKline, UK
1.8 Sodium pentobarbital	Nembutal <sup>®</sup> , USA
1.9 Seize <sup>®</sup> Classic (A) Immunoprecipitation kit	Pierce, USA
1.10 Insulin receptor $\beta$ (L55B10) mouse mAb (#3020)	Cell Signaling Technology, USA
1.11 IRS-1 antibody (#2382)	Cell Signaling Technology, USA
1.12 Akt antibody (#9272)	Cell Signaling Technology, USA
1.13 Glut4 (1F8) mouse mAb (#2213)	Cell Signaling Technology, USA
1.14 Anti – mouse IgG HRP-linked antibody (#7076)	Cell Signaling Technology, USA
1.15 Anti – rabbit IgG HRP-linked antibody (#7074)	Cell Signaling Technology, USA
1.16 LumiGLO reagent and Peroxide (#7003)	Cell Signaling Technology, USA

1.17	Prestained SDS-PAGE marker, broad range	Bio-Rad, USA
1.18	30% Acrylamide/Bis solution 37.5:1 (2.6%C)	Bio-Rad, USA
1.19	Kodak film developer	Sigma-Aldrich, USA
1.20	Kodak film fixer	Sigma-Aldrich, USA
1.21	Tris	Bio-Rad, USA
1.22	Glycine	Bio-Rad, USA
1.23	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad, USA
1.24	Ammonium persulfate (APS)	Bio-Rad, USA
1.25	TEMED	USB Corporation, USA
1.26	Leupeptin hydrochloride	Sigma-Aldrich, USA
1.27	Aprotinin, from bovine lung	Sigma-Aldrich, USA
1.28	EDTA	Merck, Germany
1.29	EGTA	Merck, Germany
1.30	Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Fluka BioChemika, Germany
1.31	DL-Dithiothreitol (DTT) solution	Fluka BioChemika, Germany
1.32	Triton X-100	Merck, Germany
1.33	Tween <sup>®</sup> 20	Merck, Germany
1.34	Acetic acid	Merck, Germany
1.35	Methanol	J.T.Baker, USA
1.36	Sodium chloride crystal	J.T.Baker, Malaysia
1.37	Glycerol (87% w/w)	Amersham Biosciences, Sweden
1.38	นมผงไขมันต่ำ Anlene	Fonterra, New Zealand
1.39	Phosphoric acid 85%	Merck, Germany
1.40	Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue G-250	USB Corporation, USA
1.41	Bromophenol Blue, sodium salt	USB Corporation, USA

## 2. เครื่องมือและอุปกรณ์

รายการ	ยี่ห้อ/บริษัท, ประเทศ
2.1 ตู้แช่แข็ง -20°C	Sanyo, Japan
2.2 ตู้แช่แข็ง -80°C รุ่น DF9017	IIShin Europe B.V., Netherlands
2.3 ตู้อบ 95°C สำหรับ microtubes รุ่น Vortemp 56	Labnet, USA
2.4 Lyophilizer รุ่น MODULYOD	Thermo Electron Corporation, UK
2.5 เครื่องชั่ง รุ่น CP224S	Sartorius, Germany
2.6 เครื่อง Microplate reader รุ่น PowerWave340	BioTek Instruments, USA
2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง Ultracentrifuge รุ่น Himac CS100	Hitachi, Japan
2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง Microcentrifuge รุ่น TX-201	TOMY, USA
2.9 เครื่อง Gel Doc สำหรับถ่ายภาพและวิเคราะห์โปรตีน	SynGene, UK
2.10 Orbital shaker รุ่น OS-10	Boeco, Germany
2.11 Magnetic stirrer	IKA Labortechnik, Germany
2.12 Vortex mixer รุ่น VX-100	Labnet, USA
2.13 Mini Trans-Blot cell (7.5 x 10 cm)	Bio-Rad, USA
2.14 Immobilon-P Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (0.45 µm poresize, 10x10 cm)	Sigma-Aldrich, USA
2.15 Kodak Light film 18x24 cm	Sigma-Aldrich, USA

### 3. การเตรียมเครื่องมือวิจัย

#### 3.1 การเตรียมสารสกัดเมล็ดองุ่น

นำเมล็ดองุ่นอบแห้ง ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท สยามไวน์เนอรี จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร มาต้มที่อุณหภูมิ 60 °C เพื่อล้างสิ่งสกปรก เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากคัดแยกเฉพาะส่วนของเมล็ดแล้ว จึงบดหยาบด้วยเครื่องบดไฟฟ้า จากนั้นต้มสกัดด้วยน้ำด้วยสัดส่วนเมล็ดองุ่น 1 ก.ก. ต่อน้ำ 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง [67] แยกทิ้งส่วนกากของเมล็ดองุ่น นำส่วนน้ำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer ที่อุณหภูมิ -50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บรรจุใส่ภาชนะที่ปิดมิดชิดและกันความชื้น แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C

หาปริมาณ total flavanols ในสารสกัดเมล็ดองุ่น ด้วยวิธี Vanillin โดยใช้ catechin เป็นสารมาตรฐาน และวิเคราะห์ปริมาณ monomeric flavanols แต่ละชนิด อาทิ catechin, epicatechin ด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณ procyanidin ในสารสกัดเมล็ดองุ่นจากผลต่างระหว่าง total flavanols และ monomeric flavanols พบว่า ในสารสกัดเมล็ดองุ่น มีปริมาณ total flavanols ร้อยละ 50.1 ประกอบด้วย monomeric flavanols ร้อยละ 1.02 และ procyanidin ร้อยละ 49.08

#### 3.2 การเตรียมสัตว์ทดลองและอาหารสำหรับสัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม จำนวน 36 ตัว น้ำหนักประมาณ 100-150 กรัม ได้รับการเลี้ยงดูในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนทำการศึกษาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ตามข้อปฏิบัติในการดูแลสัตว์ทดลอง มีการควบคุมอุณหภูมิห้องประมาณ 25°C ควบคุมความชื้น ความสว่างให้เหมาะสม และให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำไม่จำกัดปริมาณ ทั้งนี้ ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ตามประกาศครั้งที่ 10/2551 (ภาคผนวก ข)

หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาในการพักเลี้ยง ได้มีการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองอย่างสุ่ม ออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 6 ตัว เพื่อให้ได้รับอาหารสำหรับการทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ โดยมีกลุ่มควบคุม 1 กลุ่มที่ได้รับอาหารมาตรฐาน (Control diet) ส่วนอีก 5 กลุ่มที่เหลือได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณสูง (High-fructose diet) ดังส่วนผสมของอาหารสำหรับการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 โดยมีหนูในกลุ่ม High-fructose diet 3 กลุ่มที่

ได้รับการเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น (Grape seed extract; GSE) ปริมาณ 0.5%, 1.0% และ 2.0% (w/w) ตามลำดับ และอีก 1 กลุ่มที่ได้รับยารักษาโรคเบาหวานชนิด Rosiglitazone ทั้งนี้ รูปแบบของการให้อาหารหนูทดลองแต่ละกลุ่มโดยสรุปได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนผสมของอาหารสำหรับการทดลอง (กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) [74]

ส่วนผสม	Control diet	High-fructose diet
Casein (vitamin free)	200	200
Cornstarch	530	-
Sucrose	100	-
Fructose	-	630
Soybean oil	70	70
Mineral mix	35	35
Vitamin mix	10	10
Fiber	50	50
Methionine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5

ตารางที่ 3.2 แสดงรูปแบบของการให้อาหารหนูทดลองทั้ง 6 กลุ่ม

กลุ่มทดลอง	อาหารที่ได้รับระหว่างการทดลอง 8 สัปดาห์	
	4 สัปดาห์แรก	4 สัปดาห์หลัง
1. Control	Control diet	
2. High-fructose ((HF)	HF diet	
3. HF + 0.5%GSE	HF diet เสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น 0.5% ของน้ำหนักอาหาร	
4. HF + 1.0%GSE	HF diet เสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น 1.0% ของน้ำหนักอาหาร	
5. HF + 2.0%GSE	HF diet เสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น 2.0% ของน้ำหนักอาหาร	
6. HF + Rosiglitazone	HF diet เริ่มให้ยา Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg body weight ต่อวัน	

#### 4. วิธีการวิจัย

4.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract; GSE) ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว พฤติกรรม และลักษณะทางกายภาพของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF) ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

##### ขั้นตอน

1. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของหนูทดลองทุกตัวทุกๆ 4 วัน นับตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 56
2. ชั่งอาหารและตวงน้ำที่เหลือในแต่ละวันเพื่อคำนวณปริมาณอาหารและน้ำที่หนูทดลองกิน
3. สังเกตความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นกับหนูทดลอง เช่น อาการเบื่ออาหาร อาการเซื่องซึมหรือกระตือรือร้นผิดปกติ รวมถึงลักษณะสีของไบฮูและดวงตา เป็นต้น

4.2 การศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

##### ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือด

1. งดให้อาหารหนูทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ก่อนทำการเจาะเก็บเลือดในวันที่ 0 (baseline) วันที่ 28 (4 สัปดาห์) และวันที่ 56 (8 สัปดาห์) ของการทดลอง
2. ในวันที่ 0 และ 28 ของการทดลอง ทำการเจาะเก็บเลือดหนูทดลองจากเส้นเลือดดำที่หาง (lateral vein) ด้วยเข็มเบอร์ 26<sup>1/2</sup> ให้ได้ปริมาตรอย่างน้อย 0.25 ml ใส่ในหลอด Eppendorf ที่มีสารกันเลือดแข็ง
3. ในวันที่ 56 หรือวันสุดท้ายของการทดลอง ทำการเจาะเก็บเลือดหนูทดลองจากหัวใจ (cardiac puncture) ด้วยเข็มเบอร์ 21 และกระบอกฉีดขนาด 5 ml แล้วใส่เลือดในหลอดทดลองที่มีสารกันเลือดแข็ง (ขั้นตอนการเตรียมหนูทดลองก่อนการเจาะเก็บเลือดจากหัวใจจะกล่าวในหัวข้อการเก็บตัวอย่างเลือดและกล้ามเนื้อของขาหลังของหนูทดลอง หน้า 47)
4. ปั่นแยกพลาสมาที่ความเร็ว 3500 rpm นาน 5 นาที
5. แบ่งพลาสมาสำหรับตรวจระดับน้ำตาลกลูโคสอย่างน้อย 10  $\mu$ l และระดับอินซูลินอย่างน้อย 50  $\mu$ l
6. ระหว่างรอการตรวจวิเคราะห์ให้เก็บพลาสมาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

### ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

- 1) การตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Glucose oxidase
  - 1.1 เตรียมน้ำยา PGO enzyme โดยละลายเอนไซม์ 1 แคปซูลในน้ำกลั่น 100 ml แล้วเติมสารละลาย o-Dianisidine 1.6 ml
  - 1.2 เตรียมสารละลาย 2-D-glucose ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 mg/dl สำหรับการทำการกราฟมาตรฐาน (standard curve)
  - 1.3 ปิเปตสารละลาย 2-D-glucose แต่ละความเข้มข้น และพลาสมาจากแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 10  $\mu$ l
  - 1.4 เติมน้ำยา PGO enzyme ปริมาตร 1 ml ทุกตัวอย่าง เขย่าแล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที
  - 1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 nm และหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาโดยเทียบจาก standard curve
  
- 2) การตรวจวัดระดับอินซูลินด้วยชุดตรวจทดสอบ Rat Insulin Enzyme Immunoassay (SPI-Bio)
  - 2.1 เตรียมน้ำยาตรวจทดสอบตามคู่มือ
  - 2.2 ล้าง 96-well plate ที่มาพร้อมกับชุดตรวจทดสอบ 1 ครั้ง ด้วย wash buffer
  - 2.3 เติมน้ำยา สารละลายมาตรฐาน และพลาสมา ลงใน 96-well plate ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

	Blank	Non Specific Binding	Maximum Binding	Standard	Sample
Buffer	-	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-	-
Standard	-	-	-	50 $\mu$ l	-
Sample	-	-	-	-	50 $\mu$ l
Tracer	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Antiserum	-	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
	ปิดฝา plate แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง				
	ล้าง plate ด้วย wash buffer 5 ครั้ง				
Ellman's reagent	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
	นำ plate ไป incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องบน orbital shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที				

2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 414 nm

2.5 สร้าง standard curve จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานหลายความเข้มข้น โดยกำหนดให้แกน X เป็นค่า log ของความเข้มข้น แล้วหาความเข้มข้นของอินซูลินในพลาสมาโดยเทียบจาก standard curve ดังกล่าวตามวิธีที่ระบุในคู่มือ ทั้งนี้ ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของอินซูลินในพลาสมา

### 3) การประเมินภาวะดื้ออินซูลินจากการคำนวณ HOMA-IR

3.1 นำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา (Fasting plasma glucose) และค่าความเข้มข้นของอินซูลินในพลาสมา (Fasting plasma insulin) ที่หาได้จากการเทียบ standard curve มาใช้ในการคำนวณค่า Homeostasis model assessment of basal insulin resistance (HOMA-IR) ซึ่งเป็นค่าดัชนีที่ใช้ประเมินภาวะดื้ออินซูลิน [75] ตามสูตรดังนี้

$$\text{HOMA-IR} = \text{Fasting glucose (mmol/L)} \times \text{Fasting insulin (\mu\text{U/mL})} / 22.5$$

$$\text{โดย } 1 \mu\text{U/mL} = 6.945 \text{ pmol/L (SI units)}$$

3.2 ประเมินภาวะดื้ออินซูลินของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วย High-fructose diet ในแต่ละกลุ่มการทดลองจากค่า HOMA-IR ที่ได้ เทียบกับกลุ่มควบคุม

### 4.3 การศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อระดับไขมันในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

#### ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือด

1. งดให้อาหารหนูทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ก่อนทำการเจาะเก็บเลือดในวันที่ 56 (8 สัปดาห์) ของการทดลอง
2. เจาะเก็บเลือดหนูทดลองจากหัวใจ (cardiac puncture) ด้วยเข็มเบอร์ 21 และกระบอกฉีดยาขนาด 5 ml แล้วใส่เลือดในหลอดทดลองที่มีสารกันเลือดแข็ง (ขั้นตอนการเตรียมหนูทดลองก่อนการเจาะเก็บเลือดจากหัวใจจะกล่าวในหัวข้อการเก็บตัวอย่างเลือดและกล้ามเนื้อของขาหลังของหนูทดลอง หน้า 47)
- 3.ปั่นแยกพลาสมาที่ความเร็ว 3500 rpm นาน 5 นาที
4. แบ่งพลาสมาสำหรับตรวจระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ HDL อย่างละไม่ต่ำกว่า 10  $\mu\text{l}$



5. ระหว่างรอการตรวจวิเคราะห์ให้เก็บพลาสมาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

#### ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

- 1) การตรวจวัดระดับคอเลสเตอรอลด้วยชุดตรวจทดสอบ Cholesterol liquicolor (Human<sup>®</sup>)
  - 1.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (standard) ความเข้มข้น 200 mg/dl หรือตัวอย่างพลาสมา (sample) ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ใส่ในหลอดทดลอง
  - 1.2 เติม Enzyme reagent ลงในหลอด standard หลอด sample และหลอด reagent blank หลอดละ 1000  $\mu\text{l}$
  - 1.3 เขย่า แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หรือที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 5 นาที
  - 1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของ standard, sample และ reagent blank ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 nm ภายในเวลา 60 นาที
  - 1.5 คำนวณค่าความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลในพลาสมา ด้วยสูตร

$$C = 200 \times (\Delta A_{\text{Sample}} / \Delta A_{\text{Standard}}) \text{ mg/dl}$$

กำหนดให้

$\Delta A_{\text{Sample}}$  เป็นผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ sample กับ reagent blank

$\Delta A_{\text{Standard}}$  เป็นผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ standard กับ reagent blank

- 2) การตรวจวัดระดับไตรกลีเซอไรด์ด้วยชุดตรวจทดสอบ Triglyceride liquicolor (Human<sup>®</sup>)
  - 2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (standard) ความเข้มข้น 200 mg/dl หรือตัวอย่างพลาสมา (sample) ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ใส่ในหลอดทดลอง
  - 2.2 เติม Enzyme reagent ลงในหลอด standard หลอด sample และหลอด reagent blank หลอดละ 1000  $\mu\text{l}$
  - 2.3 เขย่า แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หรือที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 5 นาที
  - 2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของ standard, sample และ reagent blank ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 nm ภายในเวลา 60 นาที
  - 2.5 คำนวณค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา ด้วยสูตร

$$C = 200 \times (\Delta A_{\text{Sample}} / \Delta A_{\text{Standard}}) \text{ mg/dl}$$

กำหนดให้

$\Delta A_{\text{Sample}}$  เป็นผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ sample กับ reagent blank

$\Delta A_{\text{Standard}}$  เป็นผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ standard กับ reagent blank

### 3) การตรวจวัดระดับ HDL ด้วยชุดตรวจทดสอบ HDL Cholesterol (Human®)

#### ขั้นตอนการตกตะกอนไขมันชนิดอื่น (Precipitation)

1. เตรียมน้ำยาสำหรับตกตะกอนไขมันชนิดอื่น ๆ ด้วยการเจือจางน้ำยา Precipitant 1 ขวด (80 ml) ด้วยน้ำกลั่น 20 ml (หรือน้ำยา 4 ส่วน ต่อน้ำ 1 ส่วน)
2. ตกตะกอนไขมันชนิดอื่น ๆ ในตัวอย่างพลาสมา ด้วยน้ำยา Precipitant โดยเติมตัวอย่าง 50  $\mu$ l และ Precipitant ที่เจือจางแล้ว 100  $\mu$ l
3. เขย่า แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
4. Centrifuge ที่ความเร็ว 10000g อย่างน้อย 2 นาที หรือ 4000g นาน 10 นาที
5. แยกส่วนใสด้านบนซึ่งมี HDL ปนอยู่ (HDL supernatant) ออกจากตะกอนด้านล่างภายใน 1 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลด้วยน้ำยา Cholesterol (จากชุดทดสอบ Cholesterol liquicolor) ต่อไป

#### ขั้นตอนการวัดปริมาณคอเลสเตอรอล (Cholesterol Determination)

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (standard) ความเข้มข้น 50 mg/dl หรือตัวอย่างส่วนใส (sample) อย่างละ 100  $\mu$ l
2. เติม Enzyme reagent ลงในหลอด standard หลอด sample และหลอด reagent blank หลอดละ 1000  $\mu$ l
3. เขย่า แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หรือที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของ standard, sample และ reagent blank ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 nm ภายในเวลา 60 นาที
5. คำนวณค่าความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลในพลาสมา ด้วยสูตร

$$C = 150 \times (\Delta A_{\text{Sample}} / \Delta A_{\text{Standard}}) \text{ mg/dl}$$

กำหนดให้

$\Delta A_{\text{Sample}}$  เป็นผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ sample กับ reagent blank

$\Delta A_{\text{Standard}}$  เป็นผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ standard กับ reagent blank

#### 4.4 การศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูขาวที่ ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

##### ขั้นตอนการสกัด

1. ชั่งและตัดแบ่งกล้ามเนื้อขณะแข็ง ใส่ใน Hand homogenizer grinder แล้วเติม สารละลาย 0.6 M Perchloric acid ที่เย็น ในสัดส่วน 2:5 โดยน้ำหนัก
2. บดชิ้นกล้ามเนื้อจนกระทั่งมีลักษณะเป็นสารละลายเนื้อเดียว (homogeneous) ใช้เวลา ประมาณ 15 นาที โดยหล่อ่น้ำแข็งให้เย็นตลอดเวลา
3. แบ่งสารละลาย (homogenate) ที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกแบ่งใส่หลอด centrifuge ปริมาตร 0.2 ml แช่ไว้ในน้ำแข็ง เพื่อใช้ในขั้นตอนการสลายไกลโคเจน (Glycogen hydrolysis) ต่อไป ส่วนสารละลายที่เหลือ ให้นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10000g เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสเพื่อใช้วัดปริมาณกลูโคสเริ่มต้น (Tissue glucose)

##### ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

- 1) การสลายไกลโคเจน (Glycogen hydrolysis)
  - 1.1 นำ homogenate 0.2 ml ที่แบ่งใส่ไว้ในหลอด centrifuge ในตอนแรก มาเติมสารละลาย 1M NaHCO<sub>3</sub> 0.05 ml และเอนไซม์ Glucoamylase ( $\geq 10$  kU/l) 1 ml
  - 1.2 Incubate ด้วย shaking water bath ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
  - 1.3 เติมสารละลาย 0.6 M Perchloric acid 0.5 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา
  - 1.4 เขย่าและ centrifuge ที่ความเร็ว 10000g เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสเพื่อใช้วัด ปริมาณกลูโคสรวม (Glucose determination)
- 2) การวัดปริมาณกลูโคส (Glucose determination) ด้วยวิธี Glucose oxidase
  - 2.1 นำส่วนใสที่ได้จากการสลายไกลโคเจน (Glycogen hydrolysate) และส่วนใสที่เก็บไว้ สำหรับวัดปริมาณกลูโคสเริ่มต้น (Tissue glucose) มากำจัดโปรตีนด้วยความร้อน 95°C เป็นเวลา 5 นาที (ในกรณีที่วัดค่าปริมาณกลูโคสได้ต่ำมาก ให้ใช้ผง NaHCO<sub>3</sub> ในการปรับค่า pH ของส่วนใสให้เป็นกลาง แล้ว centrifuge แยกเก็บส่วนใสอีกครั้ง)
  - 2.2 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, และ 0.5 mg/ml

- 2.3 ปิเปตส่วนใสทั้งสองส่วนที่ได้จากข้อ 2.1 และสารละลายกลูโคสมาตรฐานมาอย่างละ 10  $\mu$ l
- 2.4 เติมน้ำยา PGO enzyme ตัวอย่างละ 1 ml
- 2.5 เขย่าให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
- 2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 nm และหาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยเทียบจาก standard curve

### 3) การคำนวณปริมาณไกลโคเจนในกล้ามเนื้อ

- 3.1 คำนวณปริมาณ Total glucose โดยนำค่ากลูโคสของ Glycogen hydrolysate ที่ได้จากการเทียบ standard curve มาคูณ 21.875 ซึ่งเป็นค่า factor จากการสกัดและจากปฏิกิริยาการสลายไกลโคเจน
- 3.2 คำนวณปริมาณกลูโคสเริ่มต้น (Tissue glucose) โดยนำค่ากลูโคสจากการเทียบ standard curve มาคูณ 2.5 ซึ่งเป็นค่า factor จากการสกัดไกลโคเจน
- 3.3 หาปริมาณไกลโคเจน ด้วยสูตร  

$$\text{Glycogen (mg glucose/g tissue)} = \text{Total glucose} - \text{Tissue glucose}$$
- 3.4 เปรียบเทียบปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูขาวระหว่างกลุ่ม High-fructose diet กับกลุ่มควบคุม

4.5 การศึกษาผลของ GSE ต่อระดับการแสดงออก (Expression) ของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูขาวด้วยเทคนิค Western blot หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

#### ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อและวิเคราะห์

- 1) การเก็บตัวอย่างเลือดและกล้ามเนื้อของขาหลัง (Soleus muscles) ของหนูทดลอง
  - 1.1 อดอาหารหนูทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ก่อนทำการเจาะเก็บเลือดและกล้ามเนื้อของขาหลังในวันที่ 56 ของการทดลอง
  - 1.2 ฉีด Sodium pentobarbital ขนาด 60 mg/kg เข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection; i.p.) เพื่อเกิดการตอบสนองของหนูทดลองในลักษณะหลับลึก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที
  - 1.3 เมื่อหนูทดลองมีลักษณะหลับลึกและไร้การตอบสนอง ให้นำหนูทดลองมาวางในลักษณะนอนหงาย

- 1.4 ผ่าเปิดช่องท้องขึ้นมาจนถึงช่วงอกซึ่งเป็นตำแหน่งหัวใจของหนูทดลอง
  - 1.5 ใช้เข็มเบอร์ 21 และกระบอกฉีดยาขนาด 5 ml เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจในขณะที่หัวใจยังทำงาน
  - 1.6 ใส่เลือดในหลอดทดลองที่มีสารกันเลือดแข็ง เพื่อนำไปปั่นแยกพลาสมาเก็บไว้ใช้ในการตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคส ระดับฮอร์โมนอินซูลิน และระดับไขมันต่อไป
  - 1.7 ตัดกล้ามเนื้อส่วนน่องขาหลังทั้ง 2 ข้าง ในส่วนที่เรียกว่า Soleus muscles ล้างด้วย normal saline แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว
  - 1.8 นำไปเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะทำการสกัดโปรตีน
- 2) การสกัดโปรตีนจากกล้ามเนื้อน่องขาหลังของหนูทดลอง
- 2.1 ตัดแบ่งกล้ามเนื้อขณะแข็งเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.2 g ใส่ใน Hand homogenizer grinder แล้วเติม Homogenizing buffer ที่เย็น (ภาคผนวก ก ข้อ 1.) ปริมาตร 0.8 ml
  - 2.2 บดชิ้นกล้ามเนื้อเป็นเวลา 15–20 นาที หรือจนกระทั่งมีลักษณะเป็นสารละลายเนื้อเดียว (homogeneous) โดยหล่นน้ำแข็งให้เย็นตลอดเวลาเพื่อช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน
  - 2.3 ปั่นแยกโปรตีนจากเซลล์กล้ามเนื้อด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 10 นาที
  - 2.4 นำส่วนใสไปวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford จากนั้นเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot
- 3) การวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford
- 3.1 เตรียมโปรตีนมาตรฐาน (Bovine serum albumin; BSA) ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100, 200 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  โดยการทำให้ serial dilution จากสารละลาย stock ความเข้มข้น 1 mg/ml
  - 3.2 เตรียมตัวอย่างโปรตีนจากกล้ามเนื้อ (Tissue lysate) โดยการเจือจาง 1:50
  - 3.3 ปิเปต BSA แต่ละความเข้มข้นและ Tissue lysate ตัวอย่างละ 100  $\mu\text{l}$
  - 3.4 เติมน้ำยา Bradford working (ภาคผนวก ก ข้อ 2.2) ตัวอย่างละ 1 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
  - 3.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer และหาความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีนจากกล้ามเนื้อโดยเทียบจาก standard curve แล้วคูณด้วย 50 ซึ่งเป็นค่า dilution factor

#### 4) การวิเคราะห์โปรตีน ด้วยเทคนิค Western blot

Western blot เป็นเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาว่าด้วยเรื่องของการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เนื่องจากภายในเซลล์หนึ่งๆ มีการแสดงออกของโปรตีนหลากหลายชนิด ในปริมาณที่มากน้อยแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับบทบาทหน้าที่ของเซลล์นั้นๆ การศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งในเซลล์ จำเป็นต้องอาศัยวิธีการที่จำเพาะในการแยกโปรตีนชนิดนั้นออกจากโปรตีนชนิดอื่น เทคนิคนี้มีกระบวนการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าตามขนาดของโปรตีนก่อน เรียกว่า Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นจึงใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาเรียกว่า Immunoblotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายแล้วติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาซัลเฟตทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ตรวจวัดได้ จึงทำให้สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง

ในที่นี้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลิน (PI3K/Akt pathway) ภายในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูขาวในแต่ละกลุ่มทดลอง อันประกอบด้วยโปรตีนดังต่อไปนี้

1. โปรตีนตัวรับอินซูลินบนเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ Insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ )
2. โปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์ ได้แก่ Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) และ Protein kinase B (PKB/Akt)
3. โปรตีนขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ ได้แก่ Glucose transporter 4 (GLUT4)

#### ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมเจลอะครีลาไมด์ 2 ความเข้มข้น ได้แก่ Stacking gel (5%) และ Separating gel (8-10% ขึ้นอยู่กับขนาดโปรตีน) (ภาคผนวก ก ข้อ 4.1-4.3)
2. หยอด Separating gel ประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของแผ่นประกบเจล แล้วหยอดน้ำ Milli-Q ตามทันทีเพื่อให้ขอบเจลด้านบนเรียบสม่ำเสมอ ตั้งแผ่นประกบเจลทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงเทน้ำ Milli-Q ออก
3. หยอด Stacking gel แล้ววางหวี (comb) ตามทันทีเพื่อสร้างหลุมสำหรับหยอดตัวอย่างบนเจล ตั้งแผ่นประกบเจลทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงดึงหวีออก ดังรูป



4. ตั้งแผ่นประกบเจลลงใน tank สำหรับการทำให้ electrophoresis แล้วเติม running buffer (ภาคผนวก ก ข้อ 5.) ให้ท่วมเจล

#### ขั้นตอนการทำ Western blot

1. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
 

เป็นการแยกโปรตีนตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าโดยการทำโปรตีนเกิดการเสียสภาพก่อน มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

  - a) เตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยการเจือจางด้วย 2X Laemmli sample buffer (ภาคผนวก ก ข้อ 3.) ในสัดส่วน 1:1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพเป็นโครงสร้างปฐมภูมิ
  - b) หยอดโปรตีนมาตรฐานขนาดต่างๆ (Prestained SDS-PAGE marker) ปริมาตร 5  $\mu$ l ลงในหลุมแรกบนเจล
  - c) หยอดตัวอย่างโปรตีนลงในหลุมถัดมาหลุมละ 1 ตัวอย่าง โดยให้มีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากันทุกตัวอย่าง (ปริมาณ 35-150  $\mu$ g ขึ้นอยู่กับระดับความไวของการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิด)
  - d) Run electrophoresis ด้วยอุปกรณ์ชุด Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความต่างศักย์คงที่ โดยแบ่งเป็น 2 ช่วง ได้แก่
 

ช่วงที่ 1 คือ ช่วงที่โปรตีนเคลื่อนที่ผ่าน Stacking gel ใช้ความต่างศักย์ 70 V เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

ช่วงที่ 2 คือ ช่วงที่โปรตีนเคลื่อนที่ผ่าน Separating gel ใช้ความต่างศักย์ 130 V เป็นเวลาประมาณ 60 นาที หรือจนกระทั่งสีของ Laemmli sample buffer เคลื่อนที่ลงมาถึงขอบเจลด้านล่าง

## 2. Immunoblotting

เป็นการถ่ายโอนโปรตีนจากเจลมายังแผ่นเมมเบรนด้วยกระแสไฟฟ้า เพื่อนำมาจับกับแอนติบอดีจำเพาะ (primary antibody) และแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (secondary antibody) จากนั้นเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับซับสเตรท (chemiluminescence substrate) เกิดการเปล่งแสงขึ้นบริเวณที่เป็นโปรตีนที่ต้องการ สามารถนำมาตรวจวัดปริมาณของโปรตีนได้ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- หลังจาก run electrophoresis เสร็จสิ้น ให้ลอกเจลออกจากแผ่นประคบ แล้วแช่เจลลงใน transfer buffer ที่เย็น (ภาคผนวก ก ข้อ 6.) เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เช่นเดียวกับกระดาษกรองและแผ่นไฟเบอร์ที่จะใช้ในการประคบเจลกับ PVDF membrane
- เตรียมแผ่น PVDF membrane ด้วยการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ PVDF membrane มีสภาพเป็นขั้วบวก
- แช่แผ่น PVDF membrane ลงใน transfer buffer ที่เย็น จากนั้นใช้ตลับประคบในการประคบแผ่นไฟเบอร์ (fiber pad) กระดาษกรอง (filter paper) เจล และ PVDF membrane เรียงตามลำดับจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ดังรูป



- Transfer โปรตีนบนเจลมาที่ membrane ด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 100 V อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที



- e) แยก membrane ออกมาแช่ใน wash buffer (1X TBS-T) (ภาคผนวก ก ข้อ 7.) เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อล้าง transfer buffer
- f) แช่ membrane ใน blocking buffer (5% Non-fat dry milk) (ภาคผนวก ก ข้อ 8.) เพื่อกำจัด non-specific binding site บน membrane เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่อง orbital shaker
- g) ล้าง membrane ด้วย wash buffer 3 ครั้งๆละ 5 นาที
- h) แช่ membrane ใน primary antibody (แอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนแต่ละชนิด) ที่เจือจางด้วย antibody dilution buffer (5% non-fat dry milk หรือ 5% BSA ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติบอดี) สัดส่วน 1:1000 ที่อุณหภูมิ 4 °C บน orbital shaker เป็นเวลา 1 คืน
- i) ล้าง membrane 3 ครั้งๆละ 5 นาที
- j) แช่ membrane ใน secondary antibody (Anti-IgG HRP linked antibody) ที่เจือจางด้วย antibody dilution buffer สัดส่วน 1:2000 ที่อุณหภูมิห้อง บน orbital shaker เป็นเวลา 45 นาที
- k) ล้าง membrane 3 ครั้งๆละ 5 นาที
- l) แช่ membrane ในน้ำยา 1X LumiGLO and Peroxide เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเปล่งแสง chemiluminescence
- m) นำแผ่นฟิล์มเอกซเรย์มาประกบกับ membrane ทุกๆ 2 นาที รวมเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำยา developer และ fixer เป็นเวลา 2 และ 3 นาที ตามลำดับ (ทำในห้องมืด)
- n) ถ่ายรูปแผ่นฟิล์มในเครื่อง Gel Doc ด้วยโปรแกรม GeneSnap (SynGene) แล้ววัดค่าความเข้มของแถบโปรตีนที่ต้องการของแต่ละกลุ่มทดลองด้วยโปรแกรม GeneTools (SynGene)
- o) เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนระหว่างกลุ่ม High-fructose diet กับกลุ่มควบคุม โดยเทียบในหน่วย Relative unit

#### ขั้นตอนการทำ Immunoprecipitation (เฉพาะ Insulin receptor $\beta$ )

1. เตรียม immune complex ด้วยการเติมแอนติบอดีต่อ Insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ ) ลงในตัวอย่างโปรตีนที่ปรับความเข้มข้นเป็น 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ด้วยสัดส่วน 1:50 จากนั้น incubate ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C

2. นำ immune complex ที่ได้มาตรึงด้วย protein A ตามขั้นตอนที่ระบุใน Seize® Classic (A) Immunoprecipitation kit ดังนี้
  - 2.1 เติม immune complex ลงใน spin cup ที่บรรจุ protein A agarose gel 0.4 ml ผสมโดยการกวนกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
  - 2.2 ปั่นแยกส่วนที่ไม่ถูกตรึงด้วย protein A ออก ด้วยความเร็ว 4000 rpm 1 นาที
  - 2.3 ล้างเจลด้วย wash buffer แล้วปั่นทิ้ง 3 ครั้ง
  - 2.4 เติม elution buffer ปริมาตร 190  $\mu$ l แล้วทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ immune complex หลุดออกจาก protein A
  - 2.5 ปั่นเก็บส่วนที่หลุดออกมาจาก spin cup เป็น fraction 1
  - 2.6 เติม elution buffer ซ้ำ 2 ครั้ง แล้วปั่นเก็บเป็น fraction 2 และ 3
  - 2.7 นำส่วน fraction ดังกล่าวไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot ต่อไป โดยเตรียมตัวอย่างด้วย sample buffer เช่นเดียวกับการทำ SDS-PAGE ปกติ แล้วหยอดตัวอย่าง fraction ละ 15  $\mu$ l ลงบนเจล

## 5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย One-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองใช้ Least Significance Difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  โดยใช้ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Mean  $\pm$  S.E.M.) ในการนำเสนอข้อมูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

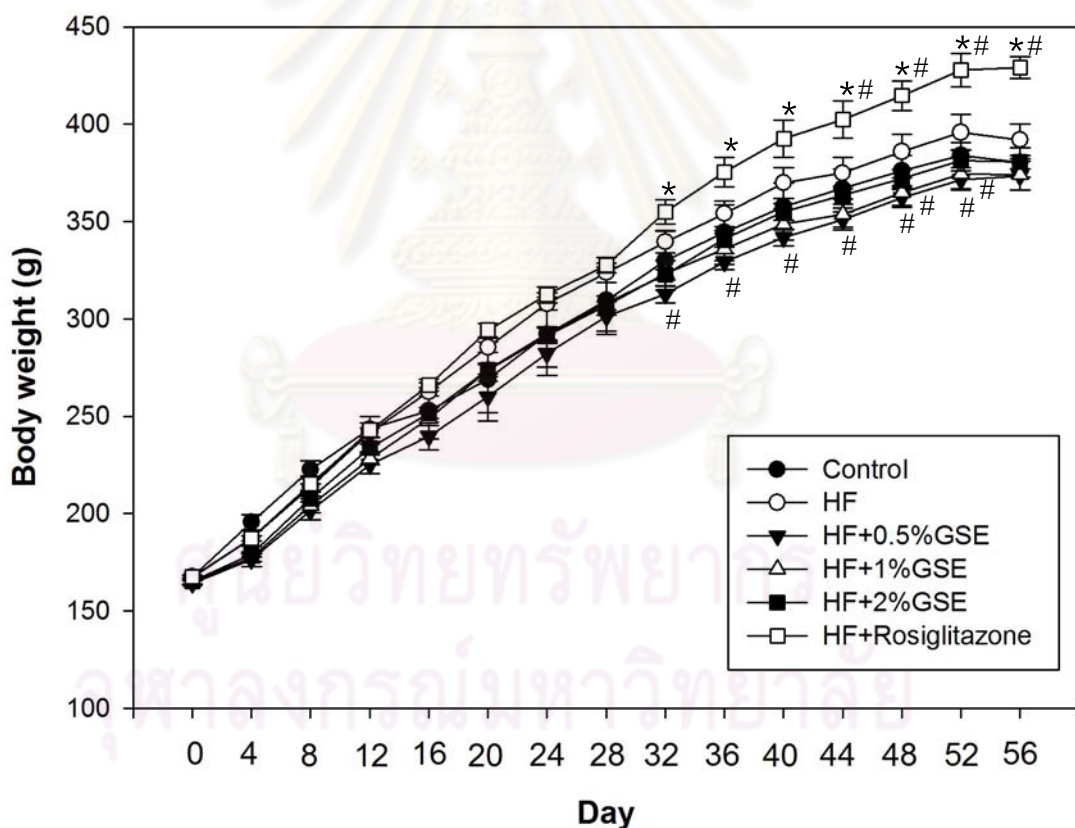
### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract; GSE) ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF) ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

1.1) พฤติกรรมและลักษณะทางกายภาพโดยทั่วไป

ไม่พบความผิดปกติด้านพฤติกรรมหรือลักษณะทางกายภาพใดๆของหนูทุกกลุ่ม การทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

1.2) น้ำหนักตัวของหนูทดลอง (Body weight)



ภาพที่ 4.1 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาการทดลอง นับตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 56

(กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet)

น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองแต่ละกลุ่มที่ซึ่งทุกๆ 4 วัน เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังจากวันที่ 28 หรือสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง

ช่วงวันที่ 32 ถึงวันที่ 40 พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ High-fructose diet (HF) เสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น (GSE) 0.5% มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยน้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว (เริ่มให้ยาในสัปดาห์ที่ 5) มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ทั้งนี้ น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองกลุ่ม Control และกลุ่มที่ได้รับ HF ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 4.1)

ช่วงวันที่ 44 ถึงวันที่ 52 พบว่า น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5% GSE ยังคงน้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่าหนูทดลองทั้งในกลุ่ม Control และกลุ่มที่ได้รับ HF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในภาพที่ 4.1

หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control และกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวเริ่มต้น (body weight gain) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1% และ 2% GSE มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยหลัง 8 สัปดาห์ และ body weight gain ไม่แตกต่างจากกลุ่ม Control และ กลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4.1)

### 1.3) ปริมาณอาหารและน้ำที่หนูทดลองกินในแต่ละวัน

การกินอาหารของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1%, 2% GSE และยา Rosiglitazone มีปริมาณโดยเฉลี่ยไม่แตกต่างจากปริมาณการกินอาหารต่อวันของหนูทดลองกลุ่ม Control และกลุ่มที่ได้รับ HF ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ส่วนการกินน้ำของหนูทดลอง ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างปริมาณการกินน้ำโดยเฉลี่ยต่อวันของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 4.2)

**ตารางที่ 4.1** แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักและการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของหนูทดลองหลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

Parameters	Control	HF	HF+0.5%GSE	HF+1%GSE	HF+2%GSE	HF+Rosiglitazone
Body weight (g)	380.2 ± 7.5	392.0 ± 8.1	373.5 ± 7.3	374.2 ± 8.1	380.5 ± 3.5	429.0 ± 5.5 <sup>*#</sup>
Body weight gain (g)	212.7 ± 8.1	224.8 ± 8.6	209.2 ± 6.7	209.3 ± 8.4	215.2 ± 4.0	261.5 ± 5.9 <sup>*#</sup>

**ตารางที่ 4.2** แสดงปริมาณการกินอาหารและน้ำของหนูทดลองโดยเฉลี่ยต่อวัน

Parameters	Control	HF	HF+0.5%GSE	HF+1%GSE	HF+2%GSE	HF+Rosiglitazone
Food consumption (g/day)	17.4 ± 0.3	17.5 ± 0.3	17.3 ± 0.2	17.4 ± 0.4	17.2 ± 0.3	17.7 ± 0.1
Water consumption (ml/day)	30.8 ± 1.4	31.5 ± 2.1	28.4 ± 1.0	28.5 ± 1.3	28.7 ± 1.7	29.8 ± 0.9

ข้อมูลแสดงในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean ± SEM); N=6 โดยกำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ <sup>#</sup> $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet

## 2. ผลการศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

### 2.1) ผลของ GSE ต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูทดลอง

หลังจาก 4 สัปดาห์แรกของการให้อาหาร พบว่า หนูทดลองที่ได้รับ HF มีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Control (ตารางที่ 4.3) จากนั้นจึงเริ่มให้ยา Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว ในสัปดาห์ที่ 5 จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 8 สัปดาห์ มีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาขณะอดอาหาร (fasting plasma glucose) สูงกว่าหนูกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1%, 2% GSE และยา Rosiglitazone มีระดับน้ำตาลต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว (คิดเป็น 15.7%, 19.8%, 18.7% และ 21.1% ตามลำดับ) โดยมีเฉพาะหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 1% GSE และยา Rosiglitazone เท่านั้น ที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 4.3

### 2.2) ผลของ GSE ต่อระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาของหนูทดลอง

หลังจาก 4 สัปดาห์แรกของการให้อาหาร พบว่า หนูทดลองที่ได้รับ HF มีระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Control (ตารางที่ 4.3) จากนั้นจึงเริ่มให้ยา Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว ในสัปดาห์ที่ 5 จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดลองพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว ติดต่อกัน 8 สัปดาห์ ยังคงมีระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาขณะอดอาหาร (fasting plasma insulin) สูงกว่าหนูกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ส่วนหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone ในช่วง 4 สัปดาห์หลังของการให้อาหาร พบว่า มีระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาลดลง (คิดเป็น 36.0%) หากแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการลดลงของระดับอินซูลินในพลาสมาของหนูที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1% และ 2% GSE เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว (คิดเป็น 19.8%, 24.6% และ 19.1% ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4.3

### 2.3) การประเมินภาวะดื้ออินซูลินของหนูทดลองด้วย HOMA-IR

เมื่อคำนวณค่า HOMA-IR จากค่าน้ำตาลกลูโคสและฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาแล้ว พบว่า หลังจาก 4 สัปดาห์แรก หนูทดลองที่ได้รับ HF แสดงภาวะดื้ออินซูลินจากค่า HOMA-IR ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Control (ตารางที่ 4.3)

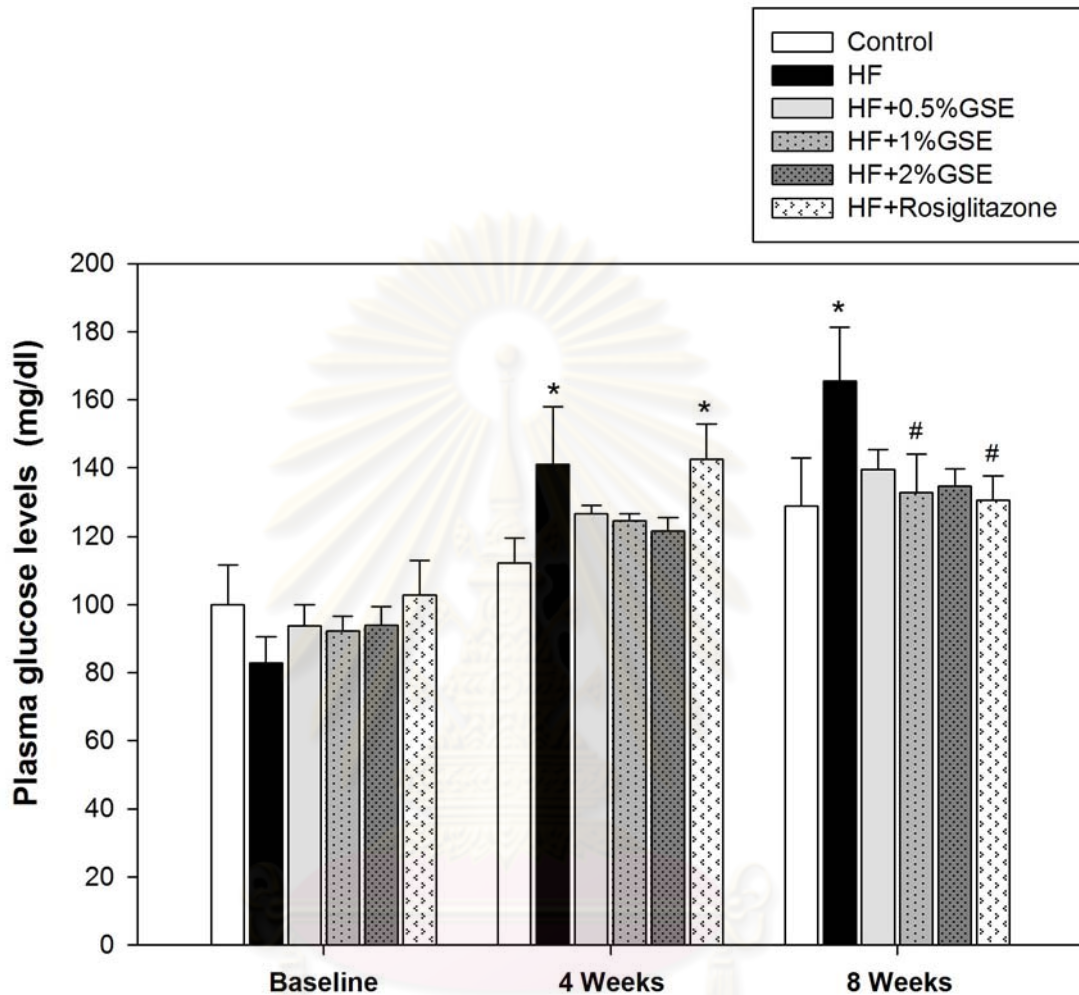
หลังสิ้นสุดระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า หนูทดลองที่ได้รับ HF เสริมด้วย GSE สามารถลดภาวะดื้ออินซูลินได้ในระดับหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากมีค่า HOMA-IR ลดลงเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว (โดย 1% GSE ลดได้มากที่สุดคือ 37.3% รองลงมาคือ 2% GSE ลดลง 35.0% และน้อยที่สุดคือ 0.5% GSE ลดลง 34.4%) หากแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone สามารถลดภาวะดื้ออินซูลินได้ โดยมีค่า HOMA-IR ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงระดับน้ำตาลกลูโคส ระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมา และค่า HOMA-IR ของหนูทดลอง

Parameters	Control	HF	HF+0.5%GSE	HF+1%GSE	HF+2%GSE	HF+Rosiglitazone
Plasma glucose (mg/dl)						
Baseline	100.0 ± 11.6	82.8 ± 7.9	93.7 ± 6.3	92.2 ± 4.3	93.9 ± 5.5	102.8 ± 10.1
4 weeks	112.2 ± 7.3	141.1 ± 16.8 *	126.5 ± 2.5	124.4 ± 2.0	121.6 ± 3.7	142.6 ± 10.3 *
8 weeks	128.7 ± 14.2	165.4 ± 15.8 *	139.4 ± 5.9	132.6 ± 11.4 #	134.5 ± 5.2	130.5 ± 7.1 #
Plasma insulin (μIU/ml)						
Baseline	16.1 ± 3.3	17.2 ± 6.8	16.1 ± 3.2	14.0 ± 2.1	15.9 ± 4.9	12.6 ± 1.8
4 weeks	29.4 ± 5.1	47.4 ± 2.7 *	35.6 ± 4.5	36.3 ± 7.2	42.1 ± 5.3	49.6 ± 9.6 *
8 weeks	62.1 ± 14.1	114.4 ± 15.9 *	91.7 ± 14.4	86.3 ± 15.9	92.5 ± 16.1	73.2 ± 9.7
HOMA-IR score						
Baseline	4.0 ± 0.9	3.8 ± 1.7	3.6 ± 0.6	3.3 ± 0.6	3.5 ± 1.0	3.2 ± 0.5
4 weeks	8.2 ± 1.5	16.9 ± 3.0 *	11.0 ± 1.3	11.2 ± 2.2	12.5 ± 1.3	17.2 ± 3.2 *
8 weeks	19.3 ± 4.9	48.3 ± 11.0 *	31.7 ± 5.7	30.3 ± 7.3	31.4 ± 6.0	23.8 ± 3.6 #

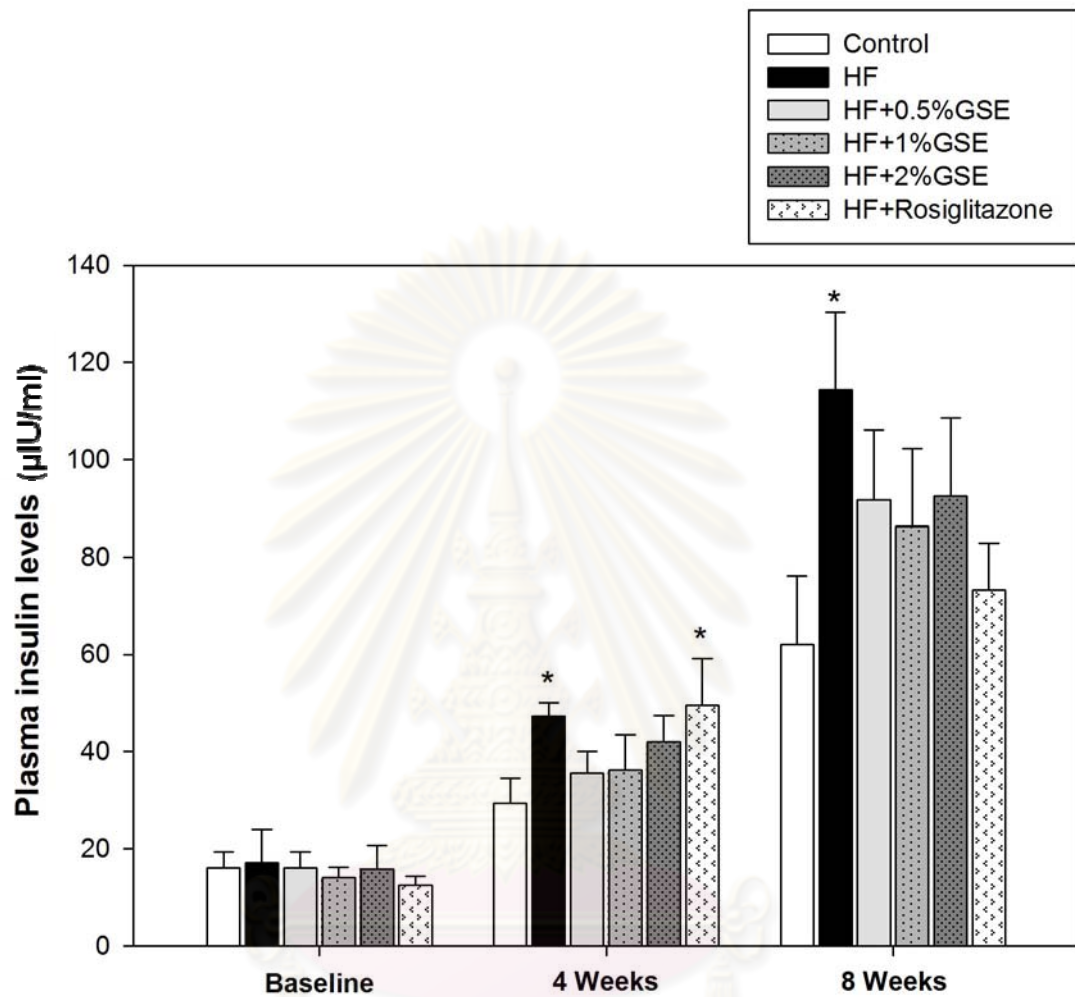
ข้อมูลแสดงในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean ± SEM); N=6 โดยกำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet





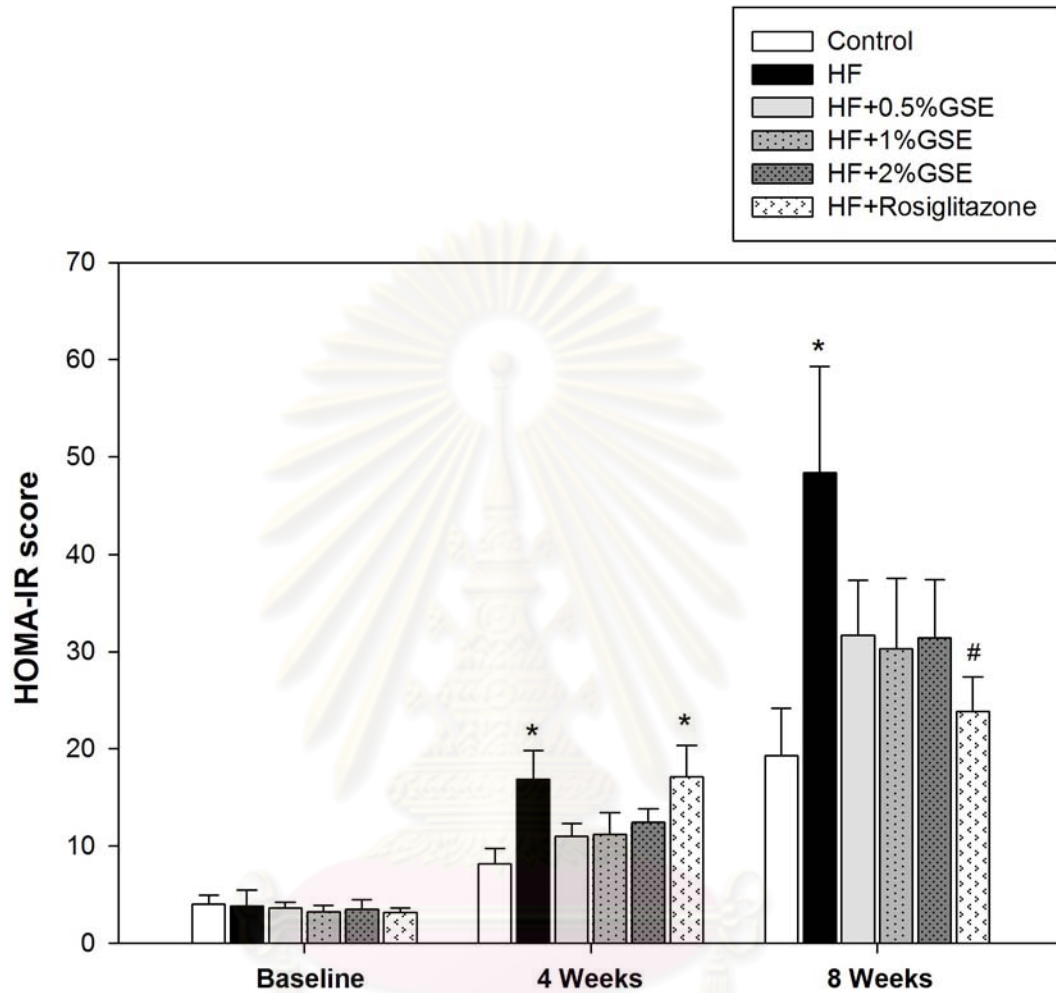
ภาพที่ 4.2 แสดงระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาขณะอดอาหารของหนูแต่ละกลุ่มทดลอง : ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาก่อนการทดลอง (ซ้าย; Baseline) , ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลัง 4 สัปดาห์ (กลาง; 4 weeks) และระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ (ขวา; 8 weeks)

(กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet)



ภาพที่ 4.3 แสดงระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาขณะอดอาหารของหนูแต่ละกลุ่มทดลอง : ระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาก่อนการทดลอง (ซ้าย; Baseline) , ระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาหลัง 4 สัปดาห์ (กลาง; 4 weeks) และระดับฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาหลังสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ (ขวา; 8 weeks)

(กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet)



ภาพที่ 4.4 แสดงระดับภาวะดื้ออินซูลินจากค่า HOMA-IR ของหนูแต่ละกลุ่มทดลอง : ค่า HOMA-IR ก่อนการทดลอง (ซ้าย; Baseline) , ค่า HOMA-IR หลัง 4 สัปดาห์ (กลาง; 4 weeks) และค่า HOMA-IR หลังสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ (ขวา; 8 weeks) (กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose die

### 3. ผลการศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อระดับไขมันในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

#### 3.1) ผลของ GSE ต่อระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมาของหนูทดลอง

หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า หนูทดลองที่ได้รับ HF ทั้งกลุ่มที่เสริมและไม่เสริมด้วย GSE มีระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมาสูงกว่าหนูกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยที่การเสริมด้วย 0.5%, 1% หรือ 2% GSE ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับคอเลสเตอรอลใน พลาสมาของหนูทดลองที่ได้รับ HF แต่อย่างใด ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone มีระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ดังแสดงในตารางที่ 4.4

#### 3.2) ผลของ GSE ต่อระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาของหนูทดลอง

เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control พบว่า ไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF นาน 8 สัปดาห์ มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ทั้งนี้ หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1% และ 2% GSE รวมถึงกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone พบว่า มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาลดลง (คิดเป็น 22.8%, 25.4%, 20.3% และ 39.0% ตามลำดับ) ต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.4)

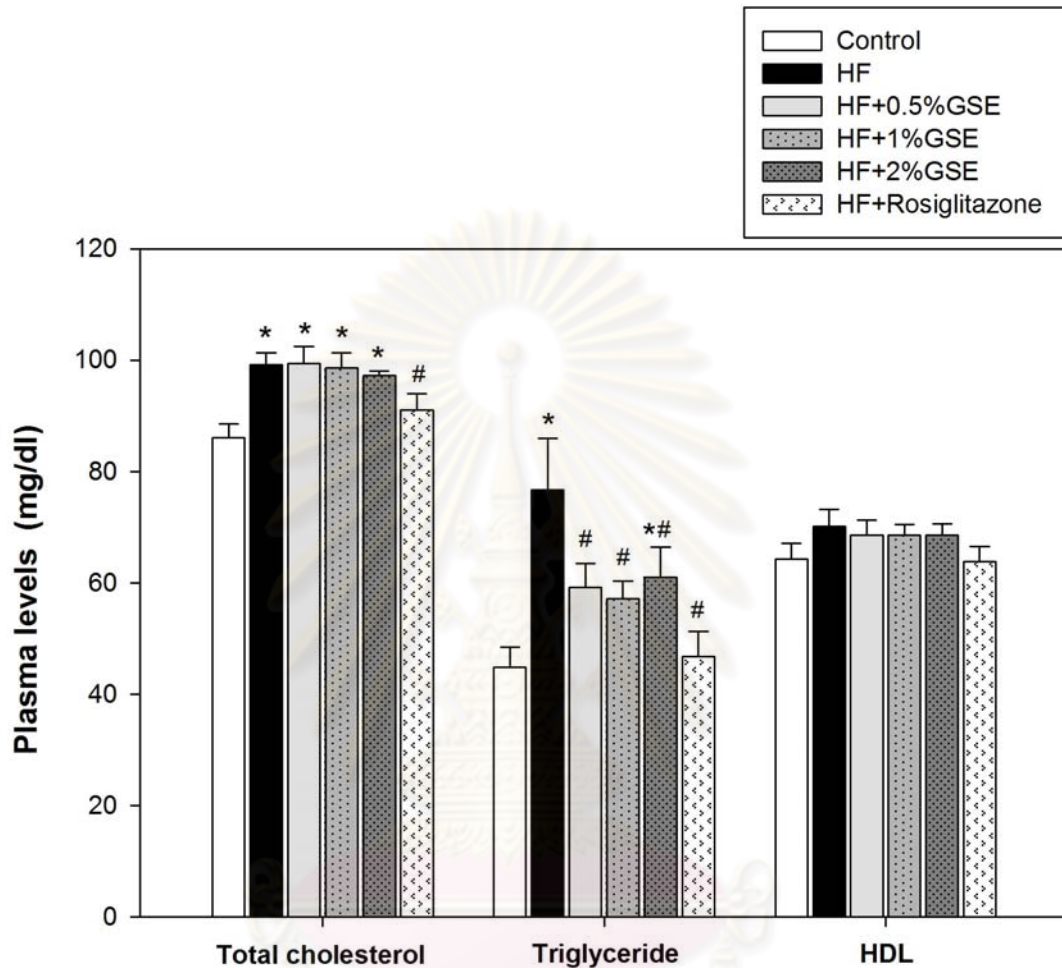
#### 3.3) ผลของ GSE ต่อระดับ HDL ในพลาสมาของหนูทดลอง

หนูทุกกลุ่มการทดลอง มีระดับ HDL ในพลาสมาหลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงระดับคอเลสเตอรอล ระดับไตรกลีเซอไรด์ และระดับ HDL ในพลาสมาของหนูทดลอง หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

Parameters	Control	HF	HF+0.5%GSE	HF+1%GSE	HF+2%GSE	HF+Rosiglitazone
Total cholesterol (mg/dl)	86.0 ± 2.5	99.2 ± 2.1 *	99.4 ± 3.0 *	98.6 ± 2.7 *	97.2 ± 0.8 *	91.0 ± 3.0 #
Triglyceride (mg/dl)	44.8 ± 3.7	76.7 ± 9.2 *	59.2 ± 4.3 #	57.2 ± 3.1 #	61.1 ± 5.4 *#	46.8 ± 4.5 #
HDL cholesterol (mg/dl)	64.3 ± 2.8	70.2 ± 3.0	68.6 ± 2.7	68.6 ± 1.9	68.5 ± 2.0	63.8 ± 2.7

ข้อมูลแสดงในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean ± SEM); N=6 โดยกำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet



ภาพที่ 4.5 แสดงระดับไขมันในพลาสมาของหนูแต่ละกลุ่มทดลองหลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ : ระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมา (ซ้าย; Total cholesterol) , ระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (กลาง; Triglyceride) และระดับ HDL ในพลาสมา (ขวา; HDL)

(กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet)

#### 4. ผลการศึกษาฤทธิ์ของ GSE ต่อปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

##### 4.1) ผลของ GSE ต่อปริมาณไกลโคเจนในกล้ามเนื้อของหนูทดลอง

หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว นาน 8 สัปดาห์ มีปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อต่ำกว่าปริมาณไกลโคเจนในกล้ามเนื้อของหนูกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

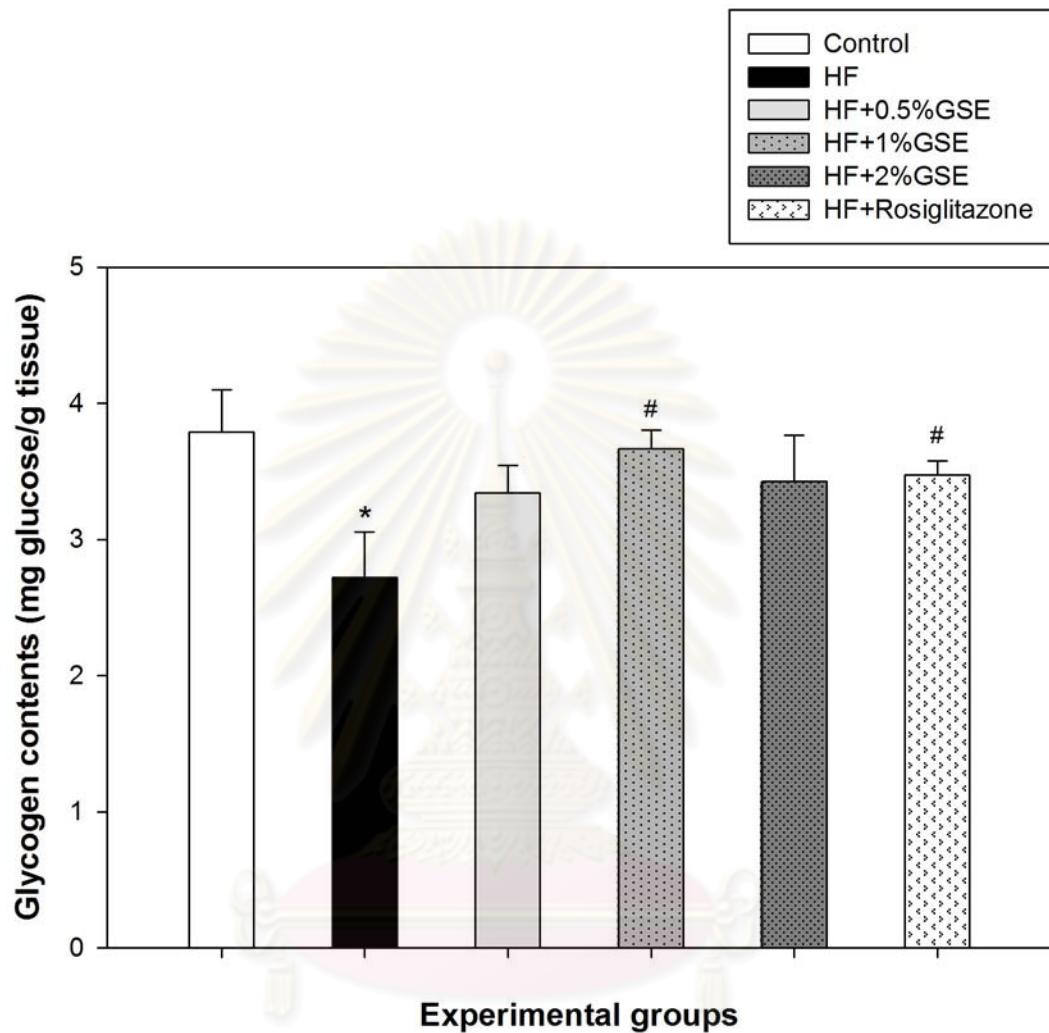
ทั้งนี้ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1%, 2% GSE และกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone มีปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อสูงขึ้น (คิดเป็น 22.2%, 37.0%, 25.9% และ 29.6% ตามลำดับ) โดยกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 1% GSE และกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone มีปริมาณไกลโคเจนสะสมในกล้ามเนื้อสูงขึ้นกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูทดลอง หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

	Control	HF	HF+0.5%GSE	HF+1%GSE	HF+2%GSE	HF+Rosiglitazone
Glycogen (mg glucose/g tissue)	3.8 ± 0.3	2.7 ± 0.3 <sup>*</sup>	3.3 ± 0.2	3.7 ± 0.1 <sup>#</sup>	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.1 <sup>#</sup>

ข้อมูลแสดงในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean ± SEM); N=6 โดยกำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ <sup>#</sup> $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet





ภาพที่ 4.6 แสดงปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูแต่ละกลุ่มทดลองหลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

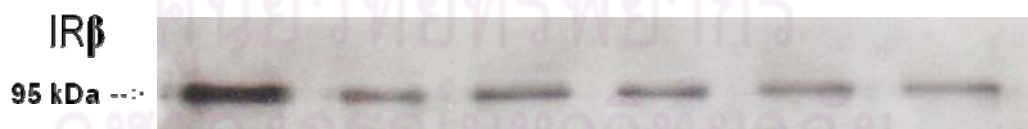
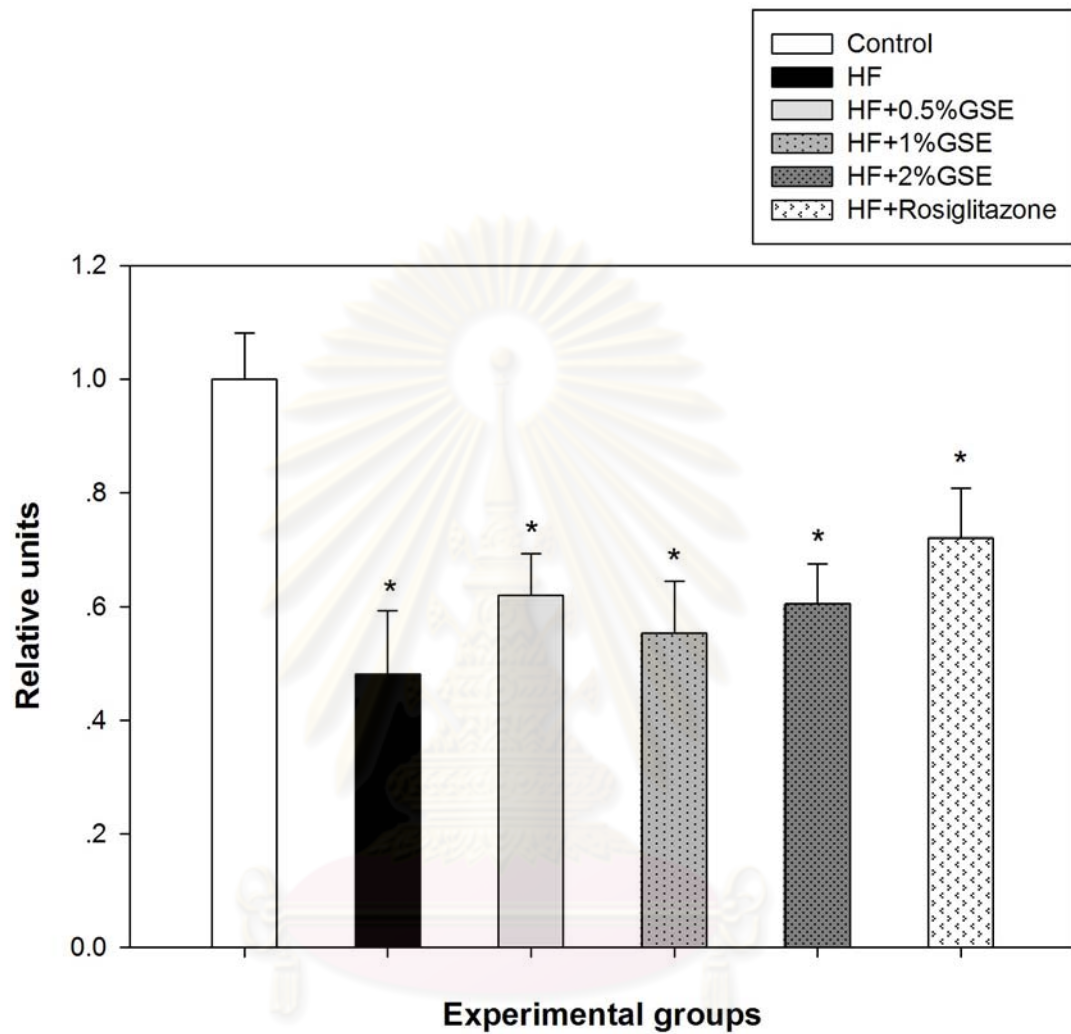
(กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet)

5. ผลการศึกษาผลของ GSE ต่อระดับการแสดงออก (Expression) ของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูขาวด้วยเทคนิค Western blot หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

5.1) โปรตีนตัวรับอินซูลินบนเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ Insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ )

การแสดงออกของ IR $\beta$  ในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานถึง 8 สัปดาห์ พบว่า มีระดับการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Control ดังภาพที่ 4.7

หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1% และ 2% GSE มีระดับการแสดงออกของ IR $\beta$  ที่เพิ่มขึ้น (คิดเป็น 29.2%, 14.6% และ 27.1% ตามลำดับ) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว ส่วนในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone พบว่ามีการแสดงออกของ IR $\beta$  ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว (คิดเป็น 50.0%) อย่างไรก็ตาม การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน (ตารางที่ 4.6)



ภาพที่ 4.7 แสดงระดับการแสดงออกของ Insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ ) ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูทดลอง (กำหนดให้  $*p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control)

5.2) โปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์ ได้แก่ Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) และ Protein kinase B (PKB/Akt)

#### 5.2.1 Insulin receptor substrate-1 (IRS-1)

การแสดงออกของ IRS-1 ในเซลล์กล้ามเนื้อเนื้อของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ติดต่อกันเป็นระยะเวลาจนถึง 8 สัปดาห์ พบว่า มีระดับการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Control ดังภาพที่ 4.8

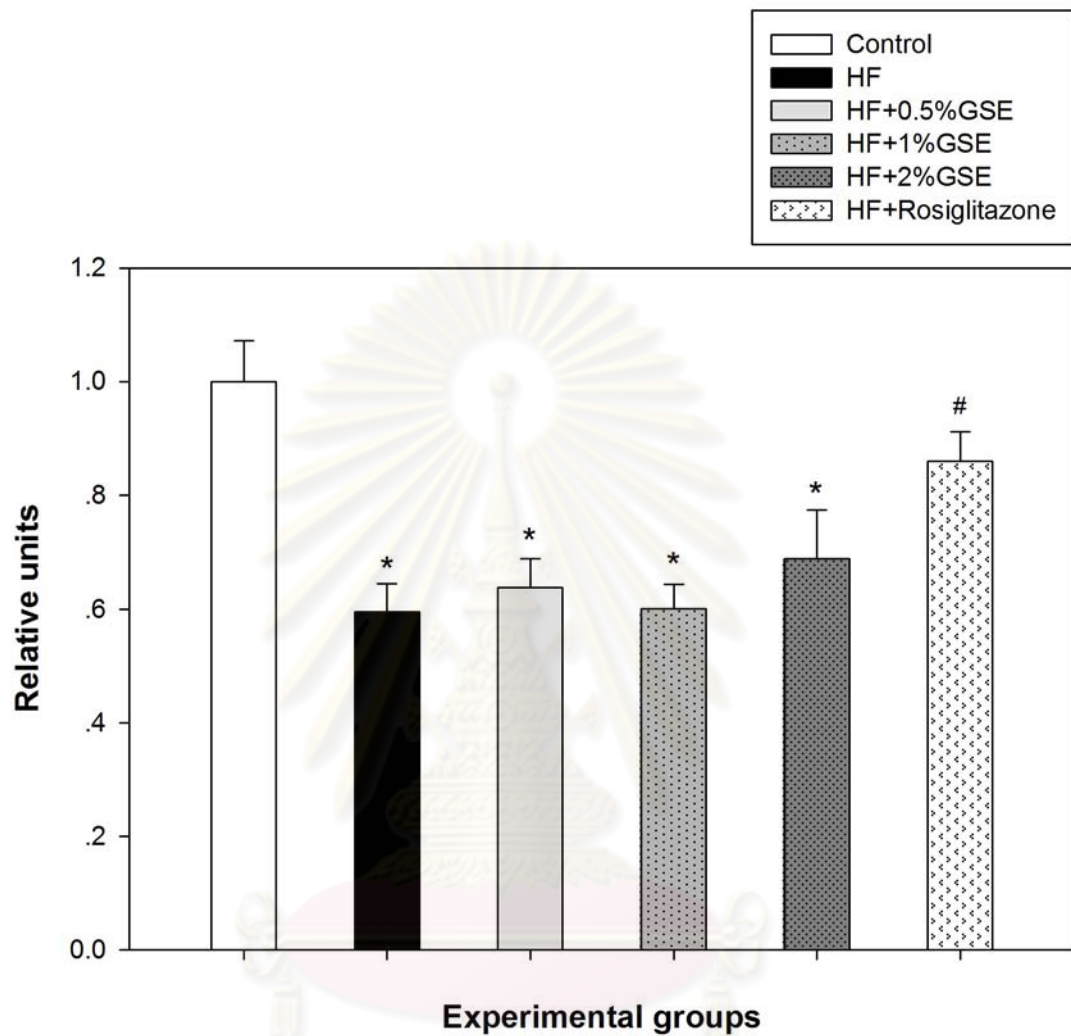
หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1% และ 2% GSE มีระดับการแสดงออกของ IRS-1 ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone มีระดับการแสดงออกของ IRS-1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF (คิดเป็น 43.3%) (ตารางที่ 4.6)

#### 5.2.2 Protein kinase B (PKB/Akt)

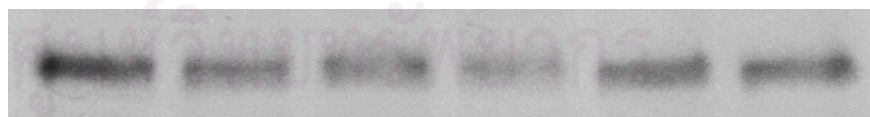
การแสดงออกของ Akt ในเซลล์กล้ามเนื้อเนื้อของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ติดต่อกันเป็นระยะเวลาจนถึง 8 สัปดาห์ พบว่า มีระดับการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Control ดังภาพที่ 4.9

หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5%, 1%, 2% GSE และกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone มีระดับการแสดงออกของ Akt เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว (คิดเป็น 43.8%, 47.9%, 41.7% และ 104.2% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม ระดับการแสดงออกของ Akt ในเซลล์กล้ามเนื้อเนื้อของหนูที่ได้รับ HF เสริมด้วย GSE ยังคงต่ำกว่าหนูกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 4.6)

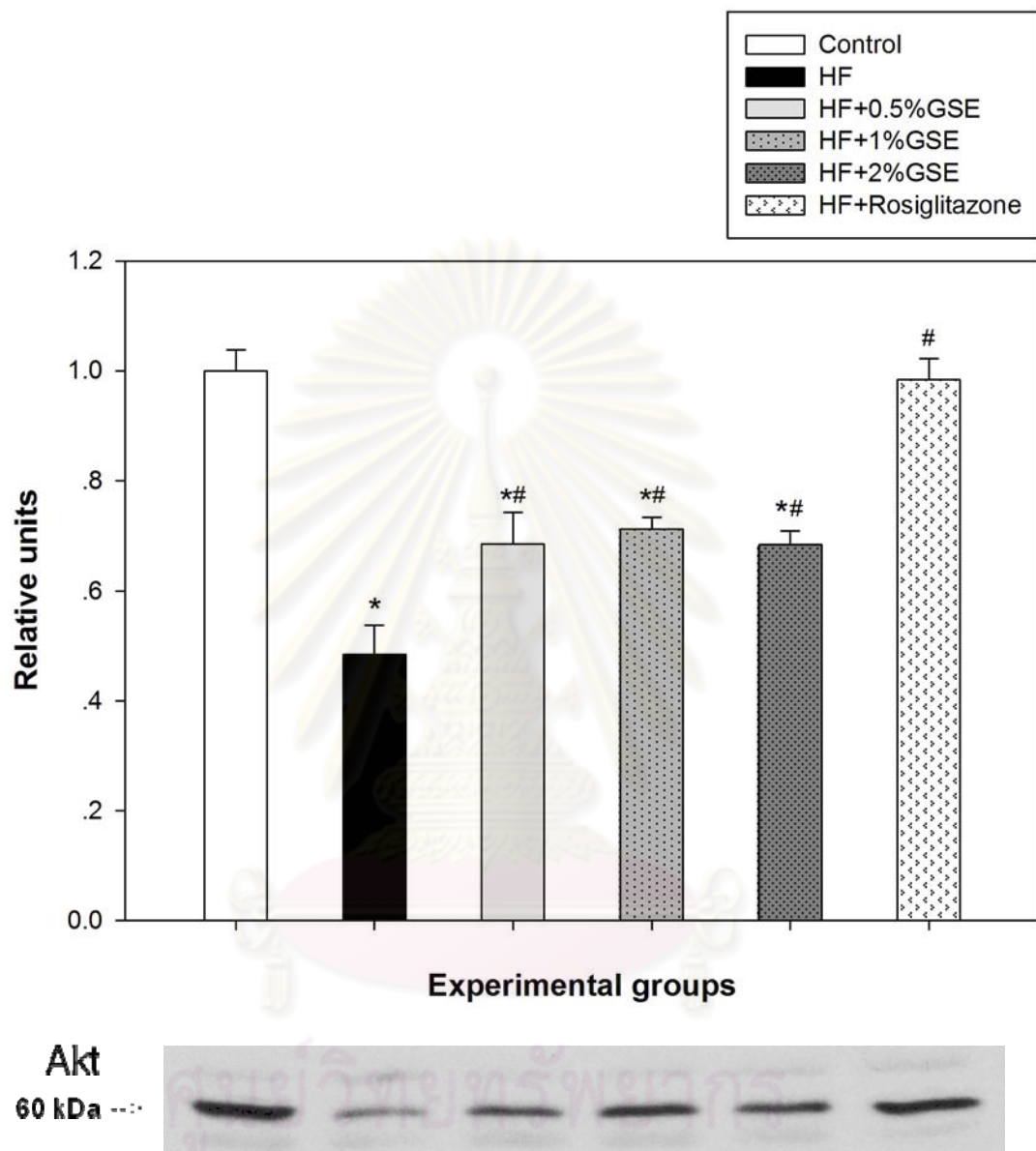
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



IRS-1  
180 kDa



ภาพที่ 4.8 แสดงระดับการแสดงออกของ Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูทดลอง (กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet)

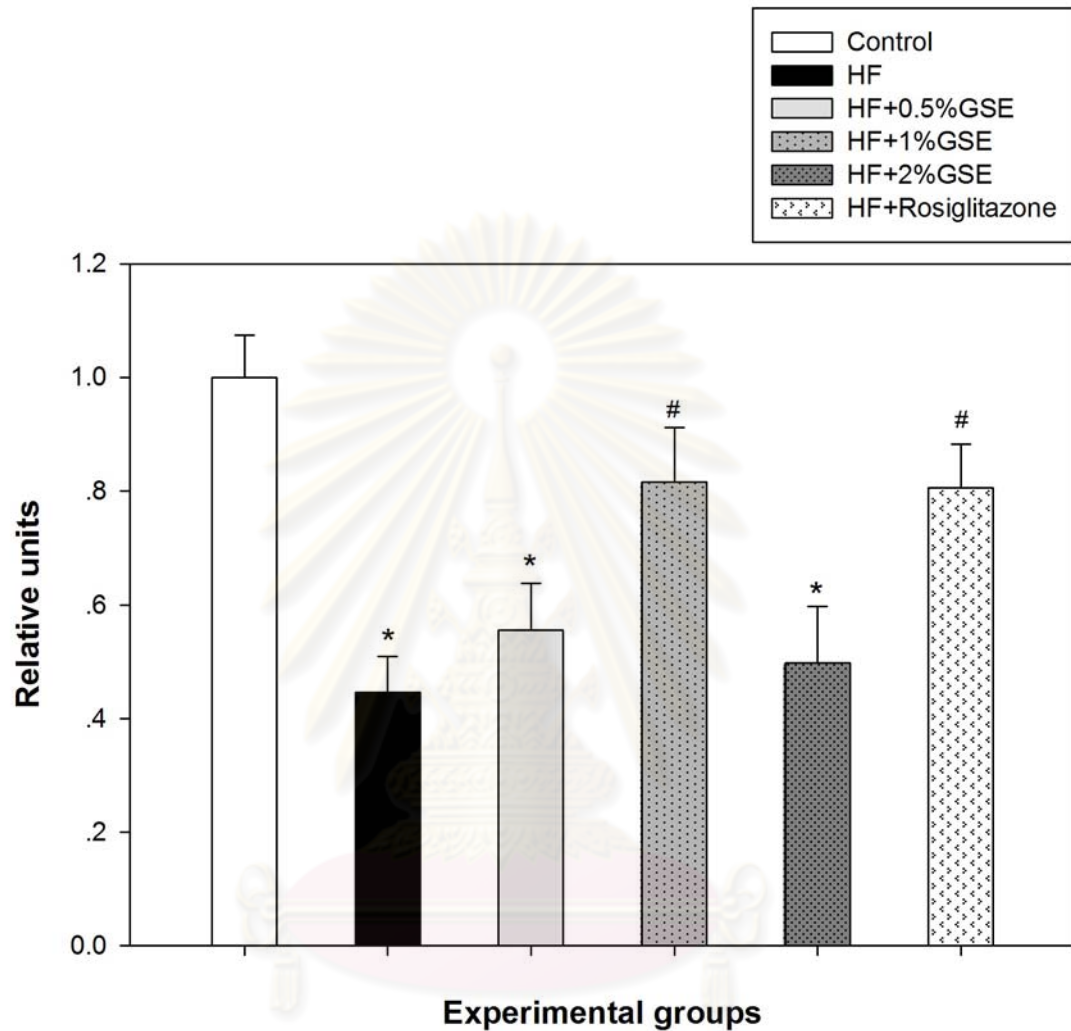


ภาพที่ 4.9 แสดงระดับการแสดงออกของ Protein kinase B (PKB/Akt) ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูทดลอง (กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet)

### 5.3) โปรตีนขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ (Glucose transporter 4; GLUT4)

การแสดงออกของ GLUT4 ในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานถึง 8 สัปดาห์ พบว่า มีระดับการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Control ดังภาพที่ 4.10

หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ HF เสริมด้วย 1% GSE และกลุ่มที่ได้รับ HF ร่วมกับยา Rosiglitazone มีระดับการแสดงออกของ GLUT4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว (คิดเป็น 82.2% และ 77.8% ตามลำดับ) ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ GLUT4 ในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูที่ได้รับ HF เสริมด้วย 0.5% และ 2% GSE เทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ HF เพียงอย่างเดียว พบว่า มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (คิดเป็น 24.4% และ 11.1% ตามลำดับ) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.6)



GLUT4

45 kDa



ภาพที่ 4.10 แสดงระดับการแสดงออกของ Glucose transporter 4 (GLUT4) ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูทดลอง (กำหนดให้ \* $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet)



ตารางที่ 4.6 แสดงระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูทดลอง หลังสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

Expression of proteins	Control	HF	HF+0.5%GSE	HF+1%GSE	HF+2%GSE	HF+Rosiglitazone
Insulin receptor $\beta$	1.00 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.11 *	0.62 $\pm$ 0.07 *	0.55 $\pm$ 0.09 *	0.61 $\pm$ 0.07 *	0.72 $\pm$ 0.09 *
Insulin receptor substrate-1	1.00 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.05 *	0.64 $\pm$ 0.05 *	0.60 $\pm$ 0.04 *	0.69 $\pm$ 0.08 *	0.86 $\pm$ 0.05 #
Protein kinase B	1.00 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.05 *	0.69 $\pm$ 0.06 *#	0.71 $\pm$ 0.02 *#	0.68 $\pm$ 0.02 *#	0.98 $\pm$ 0.04 #
Glucose transporter 4	1.00 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.06 *	0.56 $\pm$ 0.08 *	0.82 $\pm$ 0.10 #	0.50 $\pm$ 0.10 *	0.80 $\pm$ 0.08 #

ข้อมูลแสดงในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM); N=6 โดยกำหนดให้ \* $p$ <0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ # $p$ <0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม High-fructose diet

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

การให้อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ร้อยละ 63 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูเป็นโรคเบาหวานที่มีภาวะดื้ออินซูลิน พบว่า ไม่ทำให้น้ำหนักตัวหนูเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการให้สารสกัดเมล็ดองุ่น ขนาด 0.5%, 1% และ 2% เสริมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน 8 สัปดาห์ พบว่า ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนูที่แตกต่างจากหนูปกติและหนูเบาหวาน ในขณะที่การให้ยารักษาโรคเบาหวานชนิด Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว แก่หนูเบาหวานในช่วง 4 สัปดาห์หลังของการทดลอง ส่งผลให้หนูมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

2. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับฮอริโมนอินซูลินในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ร้อยละ 63 สามารถเหนี่ยวนำให้หนูเป็นโรคเบาหวานที่มีภาวะดื้ออินซูลินได้ใน 28 วัน หรือ 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง จากผลระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา ระดับฮอริโมนอินซูลินในพลาสมา และระดับภาวะดื้ออินซูลินจากการประเมินด้วย HOMA-IR ของหนูที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงหลัง 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง พบว่ามีระดับสูงขึ้นกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่หนูที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง มีระดับน้ำตาลในพลาสมา ระดับฮอริโมนอินซูลินในพลาสมา และ ค่า HOMA-IR ไม่แตกต่างจากหนูปกติ

หนูเบาหวานได้รับยารักษาโรคเบาหวานชนิด Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว ในช่วง 4 สัปดาห์หลังของการทดลอง พบว่า ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สามารถลดระดับฮอริโมนอินซูลินในพลาสมาได้ แต่ไม่มี

นัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม หลังจากนำค่าน้ำตาลกลูโคสและค่าฮอริโมนอินซูลินในพลาสมาเข้ามาคำนวณค่า HOMA-IR เพื่อประเมินภาวะดื้ออินซูลิน พบว่า การให้ยารักษาโรคเบาหวานชนิด Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว แก่หนูเบาหวานเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถลดภาวะดื้ออินซูลินของหนูเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

หลัง 8 สัปดาห์ของการทดลอง พบว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นช่วยลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูเบาหวานได้ โดยเฉพาะการเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ผลการลดระดับฮอริโมนอินซูลินในพลาสมาและค่า HOMA-IR ของสารสกัดเมล็ดองุ่น ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

### 3. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับไขมันในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

การที่หนูได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ร้อยละ 63 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งผลให้ระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาสูงขึ้นกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ระดับ HDL ในพลาสมาไม่เปลี่ยนแปลง

หลัง 8 สัปดาห์ของการทดลอง หนูที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น ขนาด 0.5%, 1% และ 2% มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดต่ำกว่าหนูเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม สารสกัดเมล็ดองุ่นไม่มีส่วนช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมาของหนูเบาหวาน และไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ HDL ในพลาสมาที่แตกต่างจากหนูปกติ

หนูเบาหวานที่ได้รับยารักษาโรคเบาหวานชนิด Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว ในช่วง 4 สัปดาห์หลังของการทดลอง มีระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาต่ำกว่าหนูเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

หนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ร้อยละ 63 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีปริมาณการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูปกติ

หลัง 8 สัปดาห์ของการทดลอง การเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อของหนูเบาหวานได้ ทั้งนี้ พบว่า หนูที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% และหนูเบาหวานที่ได้รับยารักษาโรคเบาหวานชนิด Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว มีปริมาณไกลโคเจนสะสมในกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 5. ผลการศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูขาวด้วยเทคนิค Western blot หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

โปรตีนตัวรับอินซูลินบนผิวเซลล์ ได้แก่ Insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ ) โปรตีนตัวกลางที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณภายในเซลล์ ได้แก่ Insulin receptor substrate-1 (IRS-1), Protein kinase B (PKB/Akt) และโปรตีนขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ ได้แก่ Glucose transporter 4 (GLUT4) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์กล้ามเนื้อ โดย IR $\beta$  และ IRS-1 จัดเป็นโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินในช่วงต้น ในขณะที่ Akt และ GLUT4 เป็นโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินในช่วงปลาย

จากผลการทดลองพบว่า การที่หนูได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ร้อยละ 63 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำให้ระดับการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับหนูปกติ และเมื่อได้รับยารักษาโรคเบาหวานชนิด Rosiglitazone ขนาด 4 mg/kg ของน้ำหนักตัว ในช่วง 4 สัปดาห์หลังของการทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินทั้งในช่วงต้นและช่วงปลายให้ใกล้เคียงกับหนูปกติได้ อย่างไรก็ตาม กรณีของ IR $\beta$  ไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นพบว่า ระดับการแสดงออกของ IR $\beta$  และ IRS-1 ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเสริมด้วยสารสกัด

อ้วนขนาด 0.5%, 1% และ 2% ไม่แตกต่างจากหนูเบาหวาน กล่าวคือ สารสกัดเมล็ดองุ่น ไม่มีส่วนช่วยเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินในช่วงต้น ในขณะที่ระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินในช่วงปลายมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากหนูเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากการเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น โดย Akt มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นทั้งขนาด 0.5%, 1% และ 2% ส่วนในกรณีของ GLUT4 พบว่า มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%

### อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการบรรเทาโรคต่างๆมีมาอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่สารสกัดเมล็ดองุ่นซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินซีและอีถึง 20 และ 50 เท่าตามลำดับ [58] ได้รับความสนใจมากขึ้นเช่นกัน เนื่องมาจากมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยในการนำไปใช้ [53,54] และสารสำคัญในเมล็ดองุ่นเป็นสารโพลีฟีนอล (Polyphenol) ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ชนิดโปรไซยานิดิน (Procyanidin) เป็นส่วนใหญ่ [50,67] ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย แม้แต่ความสามารถในการลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย alloxan [12] และ streptozotocin โดยการออกฤทธิ์เสมือนอินซูลิน (Insulinomimetic activity) [11] หากแต่ผลการศึกษาในเรื่องนี้ยังมีน้อย ทำให้กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษาค้างนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นในเชิงป้องกันการเกิดภาวะดื้ออินซูลินและโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ในเชิงลึกถึงระดับการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์

นอกจาก alloxan และ streptozotocin ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 1 และ 2 ตามลำดับแล้ว ยังมีการศึกษาจำนวนมากที่เลือกใช้อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet) เป็นตัวกระตุ้นการเกิดภาวะดื้ออินซูลินในสัตว์ทดลอง จากการศึกษาที่ผ่านมาถึงผลระยะยาว (Long-term effects) ของอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 15 ของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารพบว่า ขณะอดอาหารและหลังจากการทดสอบ OGTT หนูทดลองมีระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินในเลือดสูงขึ้น หลังจากได้รับอาหารเป็นเวลา 7 เดือน [13] การศึกษาของ Liu และคณะ ได้ทำการประเมินภาวะดื้ออินซูลินของหนูทดลองด้วยดัชนีแสดงภาวะดื้ออินซูลินหรือ HOMA-IR พบว่า หนูทดลองแสดงภาวะดื้ออินซูลิน

จากการที่ระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินในเลือดขณะอดอาหารสูงขึ้น หลังจากได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ร้อยละ 60 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และยังพบว่า อาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงดังกล่าว ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนุทดลองร่วมด้วย [16] เช่นเดียวกับการศึกษาในสุนัขที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงพบว่า ระดับอินซูลินและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของสุนัขขณะอดอาหารเพิ่มสูงขึ้นภายหลังการให้อาหารเพียง 25 วัน [14] นอกจากนี้ การศึกษาของ Ueno และคณะ ยังแสดงให้เห็นว่า หนูที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ร้อยละ 66 เป็นเวลา 28 วัน สามารถเหนี่ยวนำให้หนูเกิดภาวะดื้ออินซูลิน ทั้งยังส่งผลให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงขึ้น โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว [15] การศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า น้ำตาลฟรุกโตสเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สามารถส่งเสริมให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินซึ่งเป็นพยาธิสภาพสำคัญของโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า น้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 63 ของอาหารสามารถกระตุ้นการเกิดภาวะดื้ออินซูลิน เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดในระยะยาว ระดับอินซูลินในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าปกติแม้ในช่วงอดอาหาร ทำให้ค่า HOMA-IR ซึ่งใช้เป็นดัชนีมาตรฐานหนึ่งในการประเมินภาวะดื้ออินซูลิน [75] เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ยังก่อให้เกิดความผิดปกติของระดับไขมันในเลือด โดยทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี [14-16] รวมถึงมีปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดสูงขึ้นด้วย

การที่ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น (hyperglycemia) โดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง อาจเนื่องมาจากเมตาบอลิซึมของน้ำตาลฟรุกโตสในเซลล์ตับที่สามารถเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิสโดยไม่ผ่าน rate-limiting step ของปฏิกิริยา ทำให้สามารถผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมได้อย่างรวดเร็ว ต่อเนื่อง และไร้การควบคุม ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ได้แก่ pyruvate และ lactate ปริมาณมาก [18] สารเหล่านี้ยังเป็นซับสเตรท (substrate) ของกระบวนการ gluconeogenesis หรือกระบวนการผันกลับของไกลโคไลซิส ซึ่งเป็นทางหนึ่งที่เพิ่มการสังเคราะห์กลูโคสและปลดปล่อยกลูโคสออกสู่กระแสเลือด ดังนั้น การได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลานาน จึงมีส่วนส่งเสริมให้ปริมาณกลูโคสในเลือดสูงขึ้นได้

การเพิ่มสูงขึ้นของระดับอินซูลินในเลือด (hyperinsulinemia) บ่งบอกถึงภาวะดื้ออินซูลินในเนื้อเยื่อส่วนปลาย เนื่องจากตับอ่อนยังสามารถหลั่งอินซูลินเพื่อตอบสนองต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้นได้ หากต่ออวัยวะส่วนปลายตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลินได้น้อยลงด้วยสาเหตุหรือปัจจัยส่งเสริมบางประการที่เป็นผลมาจากการได้รับน้ำตาลฟรุกโตส

ปริมาณสูงเป็นเวลานาน จากรายงานเกี่ยวกับผลของน้ำตาลฟรุกโตสต่อกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลิน พบว่า การแสดงออกของโปรตีนตัวรับอินซูลินบนผิวเซลล์ (Insulin receptor) ที่เซลล์ตับและกล้ามเนื้อทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารมาตรฐาน [17] นอกจากนี้ ยังก่อให้เกิดความบกพร่องในการเติมหมู่ฟอสเฟตของ insulin receptor และ insulin receptor substrate ในเซลล์ตับและกล้ามเนื้อของหนูอย่างมีนัยสำคัญ [15] เมื่อกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์บกพร่อง อินซูลินจึงไม่สามารถทำงานเพื่อลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้ตามปกติ ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้นจึงกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้อินซูลินคั่งอยู่ในกระแสเลือดมากและยาวนานขึ้น จนเป็นเหตุให้เกิดภาวะ hyperinsulinemia ได้ในที่สุด [76]

การเพิ่มขึ้นของระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด (hypertriglyceridemia) เป็นอีกหนึ่งภาวะที่มักพบร่วมกับความผิดปกติอื่นๆ ในกลุ่ม metabolic syndrome รวมถึงโรคเบาหวานที่มีภาวะดื้ออินซูลิน [3,77] การได้รับฟรุกโตสปริมาณสูงเป็นเวลานานสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับเพิ่มขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิซึมของฟรุกโตสได้แก่ glyceraldehyde และ dihydroxyacetone phosphate (DHAP) สามารถเปลี่ยนเป็น glycerol ซึ่งเป็น substrate ในการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ได้ จากนั้นไตรกลีเซอไรด์ในตับจะรวมตัวกับคอเลสเตอรอล ฟอสโฟลิปิด และ apolipoprotein B (Apo B) เพื่อสังเคราะห์ไลโปโปรตีนชนิด very low density lipoprotein (VLDL) แล้วนำออกสู่กระแสเลือดได้มากขึ้น [18,45] หนูทดลองที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินจากการเหนี่ยวนำของน้ำตาลฟรุกโตส จึงแสดงภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) ร่วมด้วย กล่าวคือ มีระดับไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลในเลือดสูงขึ้น ภาวะดังกล่าวนี้เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ส่งเสริมการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Atherosclerosis) [78] และโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) [79] ตามมา

ภาวะอ้วน (Obesity) มักเกี่ยวข้องกับภาวะดื้ออินซูลินและเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักของโรคเบาหวานประเภทที่ 2 [35,36] เนื่องจากเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและไขมันเปลี่ยนแปลงไป มีการสังเคราะห์กรดไขมันอิสระจากเซลล์ไขมันออกสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นเหตุให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินในเนื้อเยื่ออื่นๆตามมา [77] บางครั้งเกี่ยวข้องกับความผิดปกติในการหลั่ง cytokine ในกระบวนการอักเสบ ที่ทำให้เซลล์ไขมันเกิดการอักเสบและบวม [40] นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการสะสมไขมันที่เซลล์ไขมันโดยเฉพาะบริเวณหน้าท้อง ทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น [39] อย่างไรก็ตาม ภาวะดื้ออินซูลินที่เกิดขึ้นจากการได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ร้อยละ 63 เป็นเวลา 8 สัปดาห์จากการศึกษานี้ ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการศึกษาในสัตว์ทดลองบางการศึกษา [13-16]

ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีภาวะดื้ออินซูลินนอกจากต้องควบคุมเรื่องอาหารและการออกกำลังกาย การได้รับยาที่ช่วยเพิ่มความไวของอินซูลินก็เป็นสิ่งจำเป็นในการรักษา ยาที่มีฤทธิ์ดังกล่าวคือยาในกลุ่ม thiazolidinediones (TZDs) ยากลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน nuclear receptor ภายในเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลิน ในกลุ่ม peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) โดยเฉพาะชนิด PPAR $\gamma$  โดยเข้าจับบริเวณ ligand binding ของ PPAR $\gamma$  ก่อให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่ออินซูลิน (Insulin-responsive genes) อาทิ ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนขนส่งกลูโคส (Glucose transporter; GLUT) ส่งเสริมการออกฤทธิ์ของอินซูลินในการนำน้ำตาลกลูโคสจากกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์ได้ [80] การศึกษานี้ได้เลือกใช้ยา Rosiglitazone ซึ่งเป็นตัวยานในกลุ่ม TZDs เป็น positive control ในการลดภาวะดื้ออินซูลินจากการได้รับอาหารที่มีฟรุกโตสปริมาณสูง โดยมีระยะเวลาในการให้ยา 4 สัปดาห์ภายหลังจากหยุดทดลองแสดงภาวะดื้ออินซูลิน ผลของยาสามารถปรับปรุงภาวะดื้ออินซูลิน ภาวะ hyperglycemia และ hypertriglyceridemia ที่เกิดกับหนูเบาหวานให้กลับมาใกล้เคียงภาวะปกติได้ เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [16] ในขณะที่ความสามารถในการลดภาวะ hyperinsulinemia ไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าระยะเวลาที่ให้ยาไม่เพียงพอที่ยาจะออกฤทธิ์ได้อย่างเต็มที่ในแง่ของการลดระดับอินซูลินในกระแสเลือด นอกจากนี้แล้ว ผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา Rosiglitazone จากการศึกษาที่ยังสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา กล่าวคือ หนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วยยา Rosiglitazone มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับยา [16,81]

จากการศึกษาฤทธิ์เชิงป้องกันและลดความเสี่ยงของภาวะดื้ออินซูลินโดยสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางคลินิกในหนูทดลองครั้งนี้ พบว่า การให้สารสกัดเมล็ดองุ่นพร้อมกับอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเป็นเวลารวม 8 สัปดาห์ ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณการกินอาหารและน้ำโดยเฉลี่ยต่อวันที่แตกต่างจากหนูปกติ และไม่ทำให้น้ำหนักตัวของหนูทดลองเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ที่เป็นเช่นนี้อาจอธิบายได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase (PL) และ lipoprotein lipase (LPL) โดย PL เป็นเอนไซม์ย่อยไตรกลีเซอไรด์ในอาหารก่อนดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดและนำไปเมตาบอไลซ์ที่ตับต่อไป [82] ในขณะที่เอนไซม์ LPL ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์จากไลโปโปรตีนชนิด chylomicron และ very low density lipoprotein (VLDL) ในกระแสเลือด เพื่อเก็บสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน [82] LPL จึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอ้วน และสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ได้ [83,84] การที่เอนไซม์ PL และ LPL ถูกยับยั้งการทำงานจึงส่งผลให้การดูดซึมไขมันและการสะสม



ไขมันในเซลล์ไขมันลดลง ทำให้น้ำหนักตัวไม่เพิ่มขึ้น [82] นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถลดภาวะ hypertriglyceridemia ได้ สอดคล้องกับการศึกษาหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่า สารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ชนิด procyanidin ที่พบมากในเมล็ดองุ่น สามารถยับยั้งการขนส่งไตรกลีเซอไรด์และ Apo B ออกจากเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง (HepG2 cells) และลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนูทดลอง [79] ต่อมาได้เสนอว่า procyanidin สามารถออกฤทธิ์ในการลดระดับไตรกลีเซอไรด์โดยยังยั้งการสังเคราะห์กรดน้ำดีผ่านการกระตุ้น nuclear receptor ชนิด farnesoid X receptor (FXR) รวมถึงลดการแสดงออกของ transcription factor ชนิด steroid response element binding protein 1 (SREBP1) และยับยั้งเป้าหมายของ SREBP1 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน (Lipogenesis) [85] ซึ่งจากผลการวิเคราะห์สารสกัดเมล็ดองุ่นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีปริมาณ total flavanols ร้อยละ 50.1 ประกอบด้วย procyanidin ร้อยละ 49.08 ซึ่งนับเป็นสารฟลาโวนอยด์หลักที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่น ดังนั้น กลไกดังกล่าวจึงน่าจะอธิบายความสามารถในการลดภาวะ hypertriglyceridemia ครั้งนี้ได้ และเหตุผลอีกประการหนึ่งที่มีความเป็นไปได้คือ สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ hormone-sensitive lipase (HSL) ซึ่งเป็น rate-limiting enzyme ในกระบวนการสลายไขมัน (Lipolysis) ภายในเซลล์ไขมัน [82] ผลจากกระบวนการ lipolysis ทำให้มีกรดไขมันอิสระ (free fatty acid; FFA) ปล่อยสู่กระแสเลือดมากขึ้น [86] ซึ่ง FFA เหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินที่ตับและกล้ามเนื้อได้ โดย FFA สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ตับเพื่อรวมกับกลีเซอรอล สังเคราะห์เป็นไตรกลีเซอไรด์ แล้วรวมตัวกับคอเลสเตอรอล โฟสโฟลิปิด และ apo B-100 ก่อนนำกลับสู่กระแสเลือดในรูปแบบของ VLDL มากขึ้น [19] ดังนั้นการที่สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HSL จึงมีส่วนให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดลดลงได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณคอเลสเตอรอลรวมในกระแสเลือดยังคงไม่แตกต่างจากหนูเบาหวาน นอกจากนี้ สารสกัดเมล็ดองุ่นยังมีส่วนช่วยลดความเสี่ยงของภาวะดื้ออินซูลิน จากการศึกษาภาวะ hyperglycemia, hyperinsulinemia และค่า HOMA-IR ในหนูที่ได้รับอาหารที่น้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงได้ โดยเฉพาะการเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ผลการลดระดับอินซูลินในเลือดและระดับความดื้ออินซูลินจากค่า HOMA-IR ไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นอาจเข้าไปมีบทบาทต่อกลไกที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งน้ำตาลกลูโคสเข้าเซลล์โดยตรงมากกว่าการลดระดับอินซูลิน กล่าวคือ ไม่สามารถยับยั้งการหลั่งอินซูลินของตับอ่อนได้ แต่การที่ระดับอินซูลินในเลือดลดลงอาจเป็นผลต่อเนื่องมาจากความสามารถอย่างใดอย่างหนึ่งต่อกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ที่ส่งเสริมให้อัตราการขนส่งน้ำตาลกลูโคสเข้าเซลล์

เพิ่มขึ้น ในขณะที่อาจต้องใช้เวลาระยะหนึ่งที่ตับอ่อนจะรับรู้ถึงความไวต่ออินซูลินของเนื้อเยื่อส่วนปลายที่เพิ่มขึ้นแล้วยับยั้งการผลิตและหลั่งอินซูลินออกสู่กระแสเลือด

นอกจากฟรุกโตสจะก่อให้เกิดผลการเปลี่ยนแปลงทางคลินิกแล้ว ยังมีการศึกษาอีกจำนวนหนึ่งซึ่งแสดงให้เห็นว่า การได้รับฟรุกโตสปริมาณสูงเป็นเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินได้จากภายในเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลินโดยตรง โดยก่อให้เกิดความบกพร่องของกลไกการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์ตับ เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมัน [15,17] ซึ่งน่าจะเป็นมูลเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินในเลือดสูงขึ้น จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า น้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 63 ของอาหาร ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์กล้ามเนื้อหนุ ทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งโปรตีนตัวส่งสัญญาณอินซูลินในช่วงต้น ได้แก่ Insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ ), Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) และโปรตีนตัวส่งสัญญาณในช่วงปลาย ได้แก่ Protein kinase B (Akt), Glucose transporter 4 (GLUT4) ทั้งนี้ ยารักษาโรคเบาหวานชนิด Rosiglitazone สามารถปรับปรุงกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินโดยเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว เพียงแต่ไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติในกรณีของ IR $\beta$

จากผลของสารสกัดเมล็ดคองุ่นต่อกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินภายในเซลล์กล้ามเนื้อในครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงความเชื่อมโยงกับผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดหนุที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงโดยสารสกัดเมล็ดคองุ่น แม้ว่าระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวรับอินซูลินบนผิวเซลล์ (IR $\beta$ ) และโปรตีนตัวส่งสัญญาณชนิด IRS-1 ไม่เพิ่มขึ้นในหนุที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดคองุ่น แต่โปรตีนตัวส่งสัญญาณชนิด Akt ซึ่งเป็นตัวกลางที่มีความสำคัญต่อการส่งสัญญาณหลายวิถีภายในเซลล์รวมถึงการส่งสัญญาณอินซูลิน [27] พบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากการเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดคองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีนขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ชนิด GLUT4 เพิ่มขึ้นในเซลล์กล้ามเนื้อหนุที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงร่วมกับสารสกัดเมล็ดคองุ่นขนาด 1% การที่สารสกัดเมล็ดคองุ่นช่วยลดภาวะดื้ออินซูลินด้วยการเพิ่มระดับการแสดงออกของ GLUT4 มีส่วนอย่างมากต่อการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้นจากการได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง เนื่องจาก GLUT4 เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ขนส่งน้ำตาลกลูโคสจากกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์จากการกระตุ้นของอินซูลิน โดยเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมัน เป็นกลไกอีกทางในการลดภาวะ hyperglycemia [29] ผลการกระตุ้น GLUT4 ส่วนหนึ่งมาจากการทำงานของ Akt ดังนั้น ระดับการแสดงออกของ Akt ที่เพิ่มขึ้นโดยสารสกัดเมล็ดคองุ่นจึงเป็นปัจจัยส่งเสริมอีกทางที่ช่วยปรับรูปร่างความบกพร่องของกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินที่เกิดขึ้นจากการได้รับฟรุกโตสปริมาณสูง อย่างไรก็ตาม

ก็ตาม ดังผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อตัวรับอินซูลินบนผิวเซลล์ระดับการแสดงออกลดลงจากการได้รับฟรุกโตส อินซูลินจึงทำงานได้น้อยลง ทำให้เกิดความบกพร่องในกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลินในเซลล์ ส่งผลให้การขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ลดลง น้ำตาลกลูโคสในเลือดจึงยังคงอยู่ในระดับสูงเป็นเวลานาน กระตุ้นให้  $\beta$  cells ของตับอ่อนสร้างและหลั่งอินซูลินออกสู่กระแสเลือดมากขึ้น [20] ในขณะที่การแสดงออกของตัวรับอินซูลินบนผิวเซลล์เป้าหมายไม่ได้เพิ่มขึ้นด้วย อินซูลินในเลือดจึงมีระดับสูงขึ้นตามมา สารสกัดเมล็ดคองุ่นไม่ได้เพิ่มระดับการแสดงออกของ IR $\beta$  แต่เพิ่มการแสดงออกของโปรตีนตัวส่งสัญญาณส่วนปลายคือ Akt และ GLUT4 จึงทำให้ความบกพร่องในการส่งสัญญาณดีขึ้น แม้ว่าจะช่วยลดระดับอินซูลินในเลือดได้ไม่มากนักก็ตาม แต่ก็ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงได้

เมื่อสารสกัดเมล็ดคองุ่นไม่เพิ่มระดับการแสดงออกของ IR $\beta$  ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการส่งสัญญาณต่อเนื่องภายในเซลล์ (Signal transduction) [26] IRS-1 ซึ่งเป็นตัวส่งสัญญาณตัวถัดมาก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของตัวส่งสัญญาณอินซูลินในช่วงปลาย อาจได้รับอิทธิพลจากการส่งสัญญาณทางอื่นร่วมด้วยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า adiponectin ซึ่งเป็น adipokineต่อต้านกระบวนการอักเสบ (Anti-inflammatory cytokine) ที่หลังจากเซลล์ไขมัน มีระดับลดลงในผู้ป่วยโรคอ้วนและโรคเบาหวานประเภทที่ 2 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความไวของอินซูลินกับระดับ adiponectin ในเลือด นอกจากนี้ บนผิวเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ตับยังมีการแสดงออกของโปรตีนตัวรับ adiponectin ได้แก่ adipoR1 และ adipoR2 ตามลำดับ [87] จึงเป็นไปได้ว่า การเพิ่มระดับการแสดงออกของ adiponectin และระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวรับ adiponectin บนผิวเซลล์เป้าหมายของอินซูลิน อาจส่งผลต่อการลดภาวะดื้ออินซูลินผ่านการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณอินซูลินได้ การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดคองุ่นต่อการแสดงออกของ adiponectin และโปรตีนตัวรับ adiponectin ในเซลล์กล้ามเนื้อที่มีภาวะดื้ออินซูลินจึงอาจเป็นอีกทางที่ช่วยตอบคำถามนี้ได้

การศึกษานี้ยังพบว่า การเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดคองุ่นขนาด 1% สามารถส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตัวกลางที่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ไกลโคเจนในเซลล์ได้คือ Akt โดยการทำงานของ Akt สามารถควบคุมการทำงานของโปรตีน kinase ที่ชื่อว่า glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทต่อการยับยั้งเอนไซม์ glycogen synthase ด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ glycogen synthase ส่งผลให้เอนไซม์ชนิดนี้ไม่สามารถทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไกลโคเจนจากน้ำตาลกลูโคสในเซลล์ได้ [88,89] ดังนั้น การที่ Akt เติมหมู่

ฟอสเฟตให้กับ GSK-3 จึงเป็นการยับยั้งการทำงานของ GSK-3 กล่าวคือ ชัดขวางไม่ให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟตต่อไปยังเอนไซม์ glycogen synthase ทำให้เอนไซม์ทำหน้าที่สังเคราะห์ไกลโคเจนได้ เรียกกระบวนการนี้ว่า glycogenesis [20] ผลการเพิ่มปริมาณการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อ โดยสารสกัดเมล็ดองุ่นมีความสอดคล้องกับผลการเพิ่มระดับการแสดงออกของ Akt ในเซลล์กล้ามเนื้อ จึงอาจเป็นไปได้ว่า การออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจน ซึ่งเป็นกลไกอีกทางที่สามารถลดภาวะ hyperglycemia ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อเอนไซม์ GSK-3 และ glycogen synthase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจน

กล่าวโดยสรุปได้ว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นซึ่งมีส่วนประกอบของ procyanidin ปริมาณสูง สามารถเพิ่มความไวต่ออินซูลินของเซลล์กล้ามเนื้อหนูที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง โดยเฉพาะสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% ที่ให้ผลดีที่สุดในการเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนในช่วงปลายของกระบวนการส่งสัญญาณอินซูลิน ทำให้มีการขนส่งน้ำตาลกลูโคสเข้าเซลล์เพิ่มขึ้น ทั้งยังเพิ่มการสะสมกลูโคสเป็นพลังงานสำรองในรูปของไกลโคเจนในเซลล์กล้ามเนื้อ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลง ระดับอินซูลินในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงในทางที่ลดลง เช่นเดียวกับการลดลงของระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูทดลอง ด้วยบทบาทของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการลดภาวะดื้ออินซูลินนี้ จึงเป็นอีกหนึ่งข้อมูลที่ส่งเสริมให้เกิดการพิจารณาใช้สารสกัดเมล็ดองุ่นเป็นอาหารเสริมในเชิงการป้องกันโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับการแสดงออกของ adiponectin และโปรตีนตัวรับ adiponectin ในกล้ามเนื้อเนื้อหนูที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินจากการเหนี่ยวนำของน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
2. ศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับเอนไซม์ glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) และ glycogen synthase ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจน



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- [1] Dey D, Mukherjee M, Basu D, Datta M, Roy SS, Bandyopadhyay A, et al. Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. Cell Physiol Biochem 16 (Jul 2005): 217-28.
- [2] Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. J Biosci 32 (Mar 2007): 405-13.
- [3] Yokozawa T, Kim HJ, Cho EJ. Gravinol ameliorates high-fructose-induced metabolic syndrome through regulation of lipid metabolism and proinflammatory state in rats. J Agric Food Chem 56 (Jul 2008): 5026-32.
- [4] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes : estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 27 (May 2004): 1047-53.
- [5] American Diabetes Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2002. Diabetes Care 26 (Mar 2003): 917-32.
- [6] American Diabetes Association. Total prevalence of diabetes and pre-diabetes. [Online]. 2007. Available from: <http://www.diabetes.org/diabetes-statistics/prevalence.jsp> [2007, Oct 8]
- [7] สาธารณสุข, กระทรวง. รวมข่าวประชาสัมพันธ์ภาษาไทย. [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา: <http://www.newswit.com/news/2007-08-07/0954-51d5bb50efb1640c14603311d705c73b/> [2550, ตุลาคม 30]
- [8] สํารวจสุขภาพประชาชนไทย, สำนักงาน. รวมข่าวประชาสัมพันธ์ภาษาไทย. [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา: <http://www.newswit.com/news/2007-08-09/0806-204b9b278b41474c3d3f09be1fa079/> [2550, ตุลาคม 30]
- [9] Yadav H, Jain S, Prasad G, Yadav M. Preventive effect of diabegon, a polyherbal preparation, during progression of diabetes induced by high-fructose feeding in rats. J Pharmacol Sci 105 (Sep 2007): 12-21.
- [10] Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract : importance in human health and disease prevention. Toxicology 148 (Aug 2000): 187-97.

- [11] Pinent M, Blay M, Bladé MC, Salvadó MJ, Arola L, Vol AA. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. Endocrinology 145 (Nov 2004): 4985-90.
- [12] El-Alfy AT, Ahmed AAE, Fatani AJ. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. Pharmacol Res 52 (Sep 2005): 264-70.
- [13] Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. J Nutr 111 (Feb 1981): 307-14.
- [14] Martinez FJ, Rizza RA, Romero JC. High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongrel dogs. Hypertension 23 (Apr 1994): 456-63.
- [15] Ueno M, Bezerra RMN, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJA. A high-fructose diet induces changes in pp185 phosphorylation in muscle and liver of rats. Braz J Med Bio Res 33 (Dec 2000): 1421-7.
- [16] Liu IM, Tzeng TF, Liou SS, Lan TW. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. Life Sci 81 (Nov 2007): 1479-88.
- [17] Catena C, Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Sechi LA. Cellular mechanism of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. Am J Hypertens 16 (Nov 2003): 973-8.
- [18] Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. Am J Clin Nutr 58 (Nov 1993): 754S-65S.
- [19] Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. Curr Opin Lipidol 8 (Jun 1997): 146-53.
- [20] Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signalling pathway. Curr Biol 12 (Apr 2002): R236-R8.

- [21] Dey D, Bhattacharya A, Roy SS, Bhattacharya S. Fatty acid represses insulin receptor gene expression by impairing HMGA1 through protein kinase Cepsilon. Biochem Biophys Res Commun 357 (Jun 2007): 474-9.
- [22] Kellett GL. The facilitated component of intestinal glucose absorption. J Physiol 531 (Mar 2001): 585-95.
- [23] Storgaard H, Song XM, Jensen CB, Madsbad S, Bjørnholm M, Vaag A, et al. Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant relatives with type 2 diabetes. Diabetes 50 (Dec 2001): 2770-8.
- [24] Au CS, Wagner A, Chong T, Qiu W, Sparks JD, Adeli K. Insulin regulates hepatic apolipoprotein B production independent of the mass or activity of Akt1/PKB $\alpha$ . Metabolism 53 (Feb 2004): 228-35.
- [25] Mlinar B, Marc J, Jane $\square$  A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. Clinica Chimica acta 375 (Jan 2007): 20-35.
- [26] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414 (Dec 2001): 799-806.
- [27] Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. Trends Biochem Sci 26 (Nov 2001): 657-64.
- [28] Alessi DR. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Biochem Soc Trans 29 (May 2001): 1-14.
- [29] Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol 3 (Apr 2002): 267-77.
- [30] Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. Nutr Metab 2 (Feb 2005): 1-14.
- [31] Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. Physiol Rev 87 (Apr 2007): 507-20.
- [32] Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporter and insulin action - Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. N Eng J Med 341 (Jul 1999): 248-57.
- [33] Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanisms by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1(IRS-1)-



- associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. J Biol Chem 277 (Dec 2002): 50230-6.
- [34] Kovacs P, Stumvoll M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. Clin Endocr Metab 19 (Dec 2005): 625-35.
- [35] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest 106 (Aug 2000): 473-81.
- [36] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature 444 (Dec 2006): 840-6.
- [37] Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. Diabetes 46 (Jan 1997): 3-10.
- [38] Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J clin invest 116 (Nov 2006): 3015-25.
- [39] Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. J Clin Invest 112 (Dec 2003): 1785-8.
- [40] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 112 (Dec 2003): 1796-808.
- [41] Pi-Sunyer FX. The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk. Clinical Cornerstone 8 (2006): S14-S23.
- [42] Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. J Clin Invest 108 (Dec 2001): 1875-81.
- [43] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature 420 (Nov 2002): 333-6.
- [44] Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. Am J Clin Nutr 76 (Nov 2002): 911-22.
- [45] Fried SK, Rao SP. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 78 (Oct 2003): 873S-80S.

- [46] Stanhope KL, Havela PJ. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. Curr Opin Lipidol 19 (Feb 2008): 16-24.
- [47] Lebovitz HE, Kreider M, Freed MI. Evaluation of liver function in type 2 diabetic patients during clinical trials: evidence the rosiglitazone does not cause hepatic dysfunction. Diabetes Care 25 (May 2002): 815-21.
- [48] Cao H, Hininger-Favier I, Kelly MA, Benaraba R, Dawson HD, Coves S, et al. Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet. J Agric Food Chem 55 (Jun 2007): 6372-8.
- [49] Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, et al. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. Am J Clin Nutr 77 (Jun 2003): 1466-73.
- [50] Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. J Med Food 6 (Dec 2003): 291-9.
- [51] Corder R, Mullen W, Khan NQ, Marks SC, Wood EG, Carrier MJ, et al. Oenology : Red wine procyanidins and vascular health. Nature 444 (Nov 2006): 566.
- [52] Masquelier J. Proanthocyanidin. [Online]. 2008. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Proanthocyanidin> [2008, Feb 20]
- [53] Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. Food Chem Toxicol 40 (May 2002): 599-607.
- [54] Bentivegna SS, Whitney KM. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. Food Chem Toxicol 40 (Dec 2002): 1731-43.
- [55] Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardèvol A, Bladé C, et al. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. J Nutr Biochem 20 (Mar 2009): 210-8.
- [56] Engelbrecht AM, Mattheyse M, Ellis B, Loos B, Thomas M, Smith R, et al. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and

- induces apoptosis in a colon cancer cell line. Cancer Lett 258 (Dec 2007): 144-53.
- [57] Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi M, Bagchi D. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. Toxicology 155 (Nov 2000): 83-90.
- [58] Bagchi D, Garg A, Krohn R, Bagchi M, Stohs MTS. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. Res comm mol path pharmacol 95 (Feb 1997): 179-89.
- [59] Ahn HS, Jeon TI, Lee JY, Hwang SG, Lim Y, Park DK. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: in vitro and in vivo. Nutr Res 22 (Nov 2002): 1265-73.
- [60] Vitseva O, Varghese S, Chakrabarti S, Folts JD, Freedman JE. Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. J Cardiovasc Pharmacol 46 (Oct 2005): 445-51.
- [61] Bagchi D, Kuszynski C, Balmoori J, Bagchi M, Stohs SJ. Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidized states in cultured macrophage J774A.1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. Phytother Res 12 (Dec 1998): 568 - 71.
- [62] Feng Y, Liu Y-M, Fratkins JD, LeBlanc MH. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. Brain Res Bull 66 (Jul 2005): 120-7.
- [63] Enginar H, Cemek M, Karaca T, Unak P. Effect of grape seed extract on lipid peroxidation, antioxidant activity and peripheral blood lymphocytes in rats exposed to X-radiation. Phytother Res 21 (Sep 2007): 1029-35.
- [64] Puiggròs F, Llópiz N, Ardévol A, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. J Agric Food Chem 53 (Jul 2005): 6080-6.
- [65] Morin B, Narbonne J-F, Ribera D, Badouard C, Ravanat J-L. Effect of dietary fat-soluble vitamins A and E and proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on oxidative DNA damage in rats. Food Chem Toxicol 46 (Feb 2008): 787-96.

- [66] Stanković M, Tešević V, Vajs V, Todorović N, Milosavljević S, Gođevac D. Antioxidant properties of grape seed extract on human lymphocyte oxidative defence. Planta Med 74 (Jun 2008): 730-5.
- [67] Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. J Agric Food Chem 46 (Apr 1998): 1460-4.
- [68] Ray SD, Patel D, Wong V, Rinkovsky A, Fu K, Bagchi D. Effect of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on acetaminophen-induced nephrotoxicity. J Am Coll Nutr 17 (1998): 508.
- [69] Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. Food Res Int 36 (2003): 117-22.
- [70] Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. Free Radic Biol Med 31 (Sep 2001): 729-37.
- [71] Karthikeyan K, Bai BRS, Devaraj SN. Efficacy of grape seed proanthocyanidins on serum and heart tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced myocardial injury. Vasc Pharmacol 47 (Nov-Dec 2007): 295-301.
- [72] Du Y, Guo H, Lou H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. J Agric Food Chem 55 (Feb 2007): 1695-701.
- [73] Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, et al. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. J Agric Food Chem 47 (May 1999): 1892-7.
- [74] Guo H, Ling W, Wang Q, Liu C, Hu Y, Xia M, et al. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. Plant Foods Hum Nutr 62 (Mar 2007): 1-6.
- [75] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28 (Jul 1985): 412-9.

- [76] Garvey WT, Olefsky JM, Marshall S. Insulin induces progressive insulin resistance in cultured rat adipocytes. Sequential effects at receptor and multiple postreceptor sites. Diabetes 35 (Mar 1986): 258-67.
- [77] Schwartz SL. Diabetes and dyslipidaemia. Diabetes Obes Metab 8 (Jul 2006): 355-64.
- [78] Sharrett AR, Chambless LE, Heiss G, Paton CC, Patsch W. Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate responses with asymptomatic carotid artery atherosclerosis in middle-aged men and women. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15 (Dec 1995): 2122-9.
- [79] Del Bas JM, Ricketts ML, Baiges I, Quesada H, Ardevol A, Salvadó MJ, et al. Dietary procyanidins lower triglyceride levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. Mol Nutr Food Res 52 (Oct 2008): 1172-81.
- [80] Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. Diabetes 45 (Dec 1996): 1661-9.
- [81] Kaplan F, Al-Majali K, Betteridge DJ. PPARs, insulin resistance and type 2 diabetes. J Cardiovasc Risk 8 (Aug 2001): 211-7.
- [82] Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. Nutrition 19 (Oct 2003): 876-9.
- [83] Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J Lipid Res 37 (Apr 1996): 693-707.
- [84] Wang H, Knaub LA, Jensen DR, Jung DY, Hong E-G, Ko HJ, et al. Skeletal muscle-specific deletion of lipoprotein lipase enhances insulin signaling in skeletal muscle but causes insulin resistance in liver and other tissues. Diabetes 58 (Jan 2009): 116-24.
- [85] Del Bas JM, Ricketts ML, Vaqué M, Sala E, Quesada H, Ardevol A, et al. Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. Mol Nutr Food Res 53 (Jul 2009): 805-14.

- [86] Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras J. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Annu Rev Nutr 20 (Jul 2000): 365-93.
- [87] Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. Eur Cytokine Netw 17 (Mar 2006): 4-12.
- [88] Tan J, Geng L, Yazlovitskaya EM, Hallahan DE. Protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in irradiated vascular endothelium. Cancer Res 66 (Feb 2006): 2320-7.
- [89] Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. J Cell Sci 116 (Apr 2003): 1175-86.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### 1. การเตรียม Homogenizing buffer (เก็บที่ 4°C)

250 mM Sucrose

20 mM Tris , pH 7.5

2 mM EDTA

0.5 mM EGTA

20 µg/ml Leupeptin

10 µg/ml Aprotinin

174.2 µg/ml Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

20 mM Dithiothreitol (DTT)

5% Triton X-100

### 2. การเตรียม Bradford reagent

#### 2.1 Bradford stock reagent ปริมาตร 30 ml (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

Coomassie brilliant blue G-250            35    mg

95% Ethanol                                        10    ml

85% Phosphoric acid                            20    ml

#### 2.2 Bradford working reagent ปริมาตร 100 ml (เก็บที่ 4°C)

Bradford stock reagent                        6    ml

95% Ethanol                                        3    ml

85% Phosphoric acid                            6    ml

Milli-Q water                                        85   ml



3. การเตรียม 2X Laemmli sample buffer (เก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$ )

125 M Tris-HCl, pH 6.8  
 10% 2-Mercaptoethanol หรือ DTT  
 20% Glycerol  
 4% SDS  
 0.004% Bromphenol blue

## 4. การเตรียม polyacrylamide gel

## 4.1 10 % Separating gel ปริมาตร 5 ml / 1 mini gel

Milli-Q water	1.9	ml
30% acrylamide mix 37.5 : 1 (Bio-Rad)	1.7	ml
1.5 M Tris pH 8.8	1.3	ml
10% SDS	50	$\mu\text{l}$
10% ammonium persulfate (APS)*	50	$\mu\text{l}$
TEMED*	2	$\mu\text{l}$

## 4.2 8 % Separating gel ปริมาตร 5 ml / 1 mini gel

Milli-Q water	2.3	ml
30% acrylamide mix 37.5 : 1 (Bio-Rad)	1.3	ml
1.5 M Tris pH 8.8	1.3	ml
10% SDS	50	$\mu\text{l}$
10% ammonium persulfate (APS)*	50	$\mu\text{l}$
TEMED*	3	$\mu\text{l}$

## 4.3 5 % Stacking gel ปริมาตร 3 ml / 1 mini gel

Milli-Q water	2.1	ml
30% acrylamide mix 37.5 : 1 (Bio-Rad)	0.5	ml
1.0 M Tris pH 6.8	0.38	ml
10% SDS	30	$\mu\text{l}$
10% ammonium persulfate (APS)*	30	$\mu\text{l}$
TEMED*	3	$\mu\text{l}$

\* เติมเมื่อพร้อมประกอบเจล เนื่องจากเป็นส่วนประกอบที่ทำให้เจลแข็งตัว

5. การเตรียม 1X Running buffer (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
- 25 mM Tris
  - 192 mM Glycine
  - 0.1% SDS
6. การเตรียม 1X Transfer buffer (เก็บที่ 4°C)
- 25 mM Tris
  - 192 mM Glycine
  - 20% Methanol
7. การเตรียม Wash buffer (1X TBS-T) (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
- 20 mM Tris-HCl , pH 7.5
  - 150 mM NaCl
  - 0.1% Tween-20
8. การเตรียม Blocking buffer (5% non-fat dry milk) ปริมาตร 100 ml
- |                  |        |        |
|------------------|--------|--------|
| Non-fat dry milk | 5      | g      |
| TBS-T            | ให้ครบ | 100 ml |

## ภาคผนวก ข

เลขที่ .....10/ 2551.....

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ใบอนุญาตให้ใช้สัตว์ใน  
งานวิจัย งานทดสอบ งานผลิตชีววัตถุ งานสอน และงานอื่น ๆ

---

ใบอนุญาตนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทาง  
วิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้พิจารณาโครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ป้องกันของ  
สารสกัดจากเมล็ดงุ่นต่อการต่อต้านจุลินทรีย์ในหนูขาวที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตส” ซึ่งมีรองศาสตราจารย์ สพ.ญ.  
ดร.ศิรินทร หทัยโชคอนันต์ เป็นหัวหน้าหรือเจ้าของโครงการแล้วเห็นสมควรอนุญาตให้ดำเนินการตาม  
โครงการนี้ได้ โดยมีเงื่อนไขว่าผู้ใช้สัตว์ในความรับผิดชอบของโครงการต้องปฏิบัติตามข้อมูลที่กรอกใน  
แบบฟอร์มขออนุญาตใช้สัตว์ที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับกรวิจัยอย่างเคร่งครัด  
กรณีที่มีการปฏิบัติอย่างหนึ่งอย่างใด นอกเหนือจากที่ระบุในแบบฟอร์มขออนุญาตและเสนอในโครงการ  
คณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์จะดำเนินการงดใบอนุญาต ฯ นี้ และ  
แจ้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทราบ

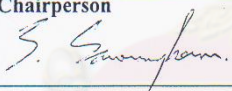
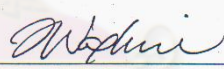
ลงนาม.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.สุวรรณีเกียรติ สว่างคุณ)  
ประธานคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและ  
การใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ลงนาม.....  
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.เจนนุช ว่องรัชชัย)  
รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ

วันที่ออกใบอนุญาต...11...มกราคม...2551.....  
วันที่หมดอายุ.....11...มกราคม...2552.....



### Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

<b>Certificate of Project Approval</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Original	<input type="checkbox"/> Renew
<b>Animal Use Protocol No.</b>		<b>Approval No.</b>	
0831010		0831010	
<b>Protocol Title</b>			
Effect of grape seed extract ( <i>Vitis vinifera</i> ) on insulin resistance in high fructose-fed rats			
<b>Principal Investigator</b>			
Assoc. Prof. Dr. Sirintorn Yibchok-A-Nun			
<b>Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)</b>			
This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.			
<b>Date of Approval</b>		<b>Date of Expiration</b>	
11 Jan 2008		11 Jan 2009	
<b>Applicant Faculty/Institution</b>			
Faculty of Veterinary Science			
<b>Signature of Chairperson</b>		<b>Signature of Authorized Official</b>	
			
<b>Name and Title</b>		<b>Name and Title</b>	
Assist. Prof. Dr. Suwanakiet Sawangkoon Chairman		Assoc. Prof. Dr. Janenuj Wongtavatchai Associate Dean (Research and Academic Service)	
<p><i>The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals.</i></p> <p><i>This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.</i></p>			

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อร่ามศรี มีพร้อม เกิดเมื่อวันอังคารที่ 28 สิงหาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับสอง สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2549 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย “90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช” จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย